

**ROLLE DER TRICARBONSÄUREN BEI DER
BEREITSTELLUNG VON NADPH FÜR MISCH-
FUNKTIONELLE OXIDATIONEN (DROGEN-
OXIDATIONEN) IN HEPATOCYTEN AUS
RATTENLEBER**

Klaus Weigl

—
1980
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0005

Aus dem Institut für Physiologische Chemie und Physikalische
Biochemie der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher

Prof. Dr. E.M. Klingenberg

Prof. Dr. H.G. Zachau

ROLLE DER TRICARBONSÄUREN BEI DER
BEREITSTELLUNG VON NADPH FÜR MISCH-
FUNKTIONELLE OXIDATIONEN (DROGEN-
OXIDATIONEN) IN HEPATOCYTEN AUS
RATTENLEBER

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von

Klaus Weigl

aus Rosenheim

1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Sies

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Theodor Bücher

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Mai 1980



Wir planen zuwenig,
wenn wir Dinge,
die in unserer Hand liegen,
dem Zufall überlassen.

Wir planen zuviel,
wenn wir das Ganze der menschlichen Dinge
in die Hand unserer Absicht nehmen
und verändern möchten.

Karl Jaspers

INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODIK	5
2.1. Isolierung von Hepatocyten	5
2.2. Beurteilung der Zellqualität	6
2.3. Zellinkubation	6
2.3.1. Inkubationsmedien	6
2.3.2. Inkubationsbedingungen	6
2.3.3. Zellkonzentration	7
2.4. Subfraktionierung mit Digitonin	7
2.5. Ermittlung des Trockengewichts	9
2.6. Bestimmung der N-Demethylierungsgeschwindigkeit des (Dimethyl- ^{14}C)Aminopyrin	10
2.6.1. Aktivität und Struktur des Aminopyrin	10
2.6.2. Inkubationsablauf	10
2.6.3. Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Aktivität	11
2.6.4. Indirekte Bestimmung der radioaktiven C_1 -Körper (Formaldehyd plus Formiat)	11
2.6.5. Direkte Bestimmung von Formaldehyd und Formiat	15
2.6.6. Einheit der N-Demethylierung	16
2.7. Photometrische Analysen	16
2.8. Reagenzien und Geräte	17
3. ERGEBNISSE	19
3.1. Die ATP/ADP-Quotienten und die Aktivitäten der Markerenzyme GIDH und LDH	19
3.1.1. Die ATP/ADP-Quotienten	19
3.1.2. Die Markerenzyme LDH und GIDH bei der Subfraktionierung mit Digitonin	20
3.2. Bildung der C_1 -Körper (CO_2 , Formiat, Formaldehyd) aus Aminopyrin	21
3.3. Bestimmung der N-Demethylierungsgeschwindigkeit am Cytochrom P-450	24

3.4.	Metabolitgehalte bei der N-Demethylierung	27
3.5.	Einfluß der Transaminasen-Hemmstoffe, Aminoxyacetat und Cycloserin, auf die N-Demethylierung von Aminopyrin	30
3.6.	Einfluß von Rhein auf die N-Demethylierung	31
4.	DISKUSSION	33
4.1.	Wahl des Monooxygenase-Substrates	33
4.2.	Auswirkungen der Drogenoxidation auf NADPH und NADP ⁺	34
4.3.	Mögliche enzymatische Reaktionen zur Bereitstellung von NADPH für das Monooxygenase-System	35
4.4.	Bedeutung der Konzentrationsveränderungen von Citrat, Isocitrat und α -Ketoglutarat in Mitochondrien und Cytosol	38
4.5.	Interaktionsmöglichkeiten zwischen dem Monooxygenase-System und biosynthetischen Prozessen	40
4.6.	Ein Transportsystem für NADPH-reduzierende Äquivalente aus den Mitochondrien in das Cytosol	42
4.7.	Die Rolle der energieabhängigen Transhydrogenase bei der NADPH-Bereitstellung	43
4.8.	Steigerung der Flußgeschwindigkeit im Citrat-Zyklus in Gegenwart eines Monooxygenase-Substrates	45
5.	ZUSAMMENFASSUNG	46
6.	LITERATURVERZEICHNIS	48

1. EINLEITUNG

Biosynthetische Leistungen des Stoffwechsels erfordern im allgemeinen reduzierende Äquivalente in Form von NADPH. Das im Endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle (und einiger anderer Zelltypen) lokalisierte Monooxygenase-System, welches im Fremdstoff-Stoffwechsel und besonders beim Arzneimittelabbau eine entscheidende Rolle spielt, benötigt ebenfalls NADPH.

Da nach Reaktion



gleichzeitig molekularer Sauerstoff eingeführt wird, spricht man auch von einer mischfunktionellen Oxidation. Die terminale Oxidase dieser Elektronentransportkette ist das Cytochrom P-450 (1, 2, 3).

Der Arzneimittelabbau ist somit in zweierlei Hinsicht mit dem Zellstoffwechsel verknüpft. Für den Sauerstoff hat sich gezeigt, daß die halbmaximale Geschwindigkeit beim Drogenumsatz in isolierten Mikrosomen wie auch in der intakten Leberzelle nahezu gleich ist, und daher kein Sauerstoff-Gradient zwischen dem Extrazellulär-Raum und dem Endoplasmatischen Retikulum besteht (4). Also stellt der Sauerstoff bei der Drogenoxidation nur dann ein Problem dar, wenn extrazellulär eine Mangelversorgung der Zelle mit Sauerstoff besteht. Aus diesem Grunde können die Sauerstoffwechselwirkungen bei der in Normoxie durchgeführten Untersuchung der NADPH-Bereitstellung unberücksichtigt bleiben.

Hinsichtlich des NADPH gibt es eine Reihe von Reaktionen im Zellstoffwechsel, welche reduzierende Äquivalente in Form von NADPH bereitstellen, die sich auch in ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden (Abbildung 1). Für einige der beteiligten Enzyme sind die Aktivitätsgehalte in der Leberzelle in Tabelle 1 dargestellt.

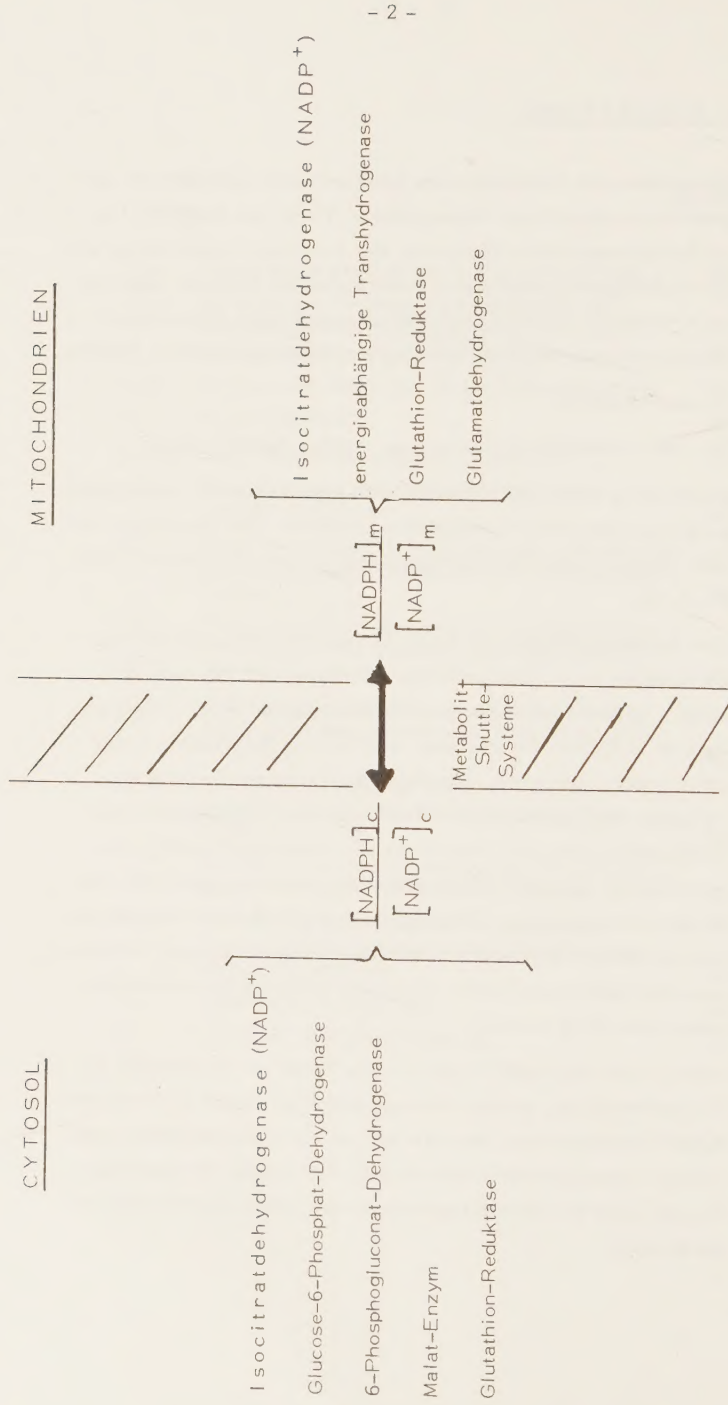


BILD 1: Mögliche enzymatische Reaktionen zur NADPH-Bereitstellung in Mitochondrien und Cytosol

TABELLE 1: AKTIVITÄTEN DER FÜR DIE NADPH - BEREITSTELLUNG WICHTIGSTEN DEHYDROGENASEN IN DER RATTENLEBER.

Die Werte sind in $\mu\text{Mol Substratumsatz} \times \text{min}^{-1} \times \text{g (Leber Feuchtgewicht)}^{-1}$ angegeben (25°C). Die jeweiligen Versuchsbedingungen sind bei den Autoren zu finden. Die von Kauffman et al. (5) gefundenen Werte wurden bei weiblichen Ratten ermittelt. Sie wurden nach einem angenommenen Proteingehalt von 0,15 g/g Feuchtgewicht berechnet. Nach Hogeboom & Schneider (6) sind etwa 80% der gesamten Aktivität der NADP^{+} -abhängigen Isocitratdehydrogenase extramitochondrial zu finden.

ENZYM	Veech et al. (7)	Kauffman et al. (5)	
	<u>NORMAL</u>	<u>NORMAL</u>	<u>PB*</u>
Isocitratdehydrogenase (NADP^{+})	22.4**	9.6**	8.6**
Malat-Enzym	1.27	0.26	0.38
Glucose-6-P-Dehydrogenase	1.42	0.66	1.14
6-P-Gluconat-Dehydrogenase	2.84	2.38	2.22

* PB = mit Phenobarbital vorbehandelte Ratten

** Werte mit Faktor 0.8 multipliziert ergibt extramitochondriale Aktivität

Was die NADPH-Bereitstellung bei der Drogenoxidation betrifft, so wird allgemein angenommen, daß in den an Glykogen reichen Lebern gefütterter Ratten die Versorgung mit NADPH durch den Pentosephosphatzyklus gewährleistet ist, während in den an Glykogen verarmten Lebern gefasteter Ratten die Oxidationsreaktion von der mitochondrialen Produktion NADPH-reduzierender Äquivalente abhängt. Dabei ist laut Tabelle 1 die Isocitratdehydrogenase am aktivsten, was man auch bei gefütterten Tieren erwarten sollte.

Vorliegende Arbeit soll folgende Frage klären : welche Rolle spielt die NADP^+ - abhängige Isocitratdehydrogenase bei der Drogenoxidation, und zwar bei gefütterten wie bei gefasteten Ratten ? Hierbei soll eine Subfraktionierung der Zellkompartimente in eine cytosolische und in eine mitochondriale Fraktion unter Verwendung der Digitonin-Methode nach Zuurendonk & Tager (8) vorgenommen werden.

Außerdem soll die N-Demethylierungsgeschwindigkeit des (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin in Hepatocyten gefütterter und gefasteter Ratten gemessen werden. Durch Verändern der jeweiligen Inkubationsbedingungen soll eine Information über die Eigenschaften des NADPH-Transfersystems aus den Mitochondrien in das Cytosol erhalten werden. Hierzu ist es jedoch notwendig, eine neue Bestimmungsmethode zu erarbeiten, die die Messung des Drogenumsatzes in intakten Zellen erlaubt.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Isolierung von Hepatocysten

Die Leber wurde isoliert perfundiert (9) und die Hepatocysten durch Perfusion mit Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* im calciumfreien Perfusat isoliert (10, 11).

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten (100-200g, Altromin-Standardnahrung, Wasser ad libitum).

Den Phenobarbital-vorbehandelten Ratten wurde Na-Phenobarbital (Luminal^R) über 3 Tage hinweg in einer täglichen Dosis von 80 mg/kg Körpergewicht (KG) intraperitoneal verabreicht (12).

Den Hungerratten wurde 20 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

Die Operation erfolgte in Pentobarbital (Nembutal^R)-Narkose (0.1 ml/100 g KG i.p.) und i.v.-Gabe von Heparin (Liquemin^R) 1000 IE/kg KG.

Die Leber wurde während der Perfusion mit Flußraten von $3.5 - 4.0 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{g(Leber feucht)}^{-1}$ über die Vena portae durchströmt. Der venöse Abfluß erfolgte über die Vena cava inferior.

Das verwendete Perfusionsmedium setzte sich,wiefolgt,zusammen:

NaCl	115 mM	Begasung O_2/CO_2 (95:5, v/v)
KCl	5.9 mM	Temperatur $28 - 30^\circ\text{C}$
MgCl_2	1.2 mM	pH 7.4
NaH_2PO_4	1.2 mM	
Na_2SO_4	1.2 mM	
NaHCO_3	25 mM	

2.2. Beurteilung der Zellqualität der isolierten Hepatocyten

Zur Beurteilung der Zellpräparation wurde gelegentlich der Ausschluß von Trypanblau (größer 95%) überprüft; routinemäßig wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase extra- und intrazellulär bestimmt. Außerdem wurde mit ATP/ADP-Quotienten der Zustand energieliefernder Stoffwechselprozesse beurteilt.

2.3. Zellinkubation

2.3.1. Inkubationsmedien

Die Inkubation der Leberzellen gefütterter Ratten erfolgte im Perfusionsmedium (siehe 2.1.), jedoch mit CaCl_2 (2.5 mM).

Außerdem wurden noch folgende Substrate zugegeben :

L-Lactat	2.1 mM
Pyruvat	0.3 mM
Glucose	10 mM
D,L - β -Hydroxybutyrat	0.6 mM
Acetoacetat	0.3 mM
L-Ornithin	2 mM

Dieses Medium wird im folgenden als Inkubationspuffer bezeichnet.

Bei den Versuchen mit Hepatocyten gefasteter Ratten wurde das Perfusionsmedium (2.1.) mit CaCl_2 (2.5 mM) verwendet, jedoch ohne Substratzusätze.

In Versuchen, in denen die N-Demethylierung des (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin gemessen wurde, waren noch 0.2 mM Methionin (13) dem jeweiligen Medium (gefastete oder gefütterte Ratte) zugesetzt.

2.3.2. Inkubationsbedingungen

Zuerst wurde das Medium zum Zweck der Äquilibration und anschließend zusammen mit der Zellsuspension in den Inkubationsgefäßen mit einem O_2/CO_2 - Gemisch (95:5, v/v) begast, wobei hinsichtlich des Gasaustausches ein offenes System bestand.

Die Temperatur betrug in der Inkubation 37°C . Der Inkubator hatte eine Schüttelfrequenz von 120 min^{-1} .

Der Zeitablauf war in den Versuchen, in denen einige Metabolite des Citratzyklus bestimmt werden sollten, so, daß nach einer 10 minütigen Äquilibrierungsphase der Zellinkubation Aminopyrin zugegeben wurde. Fünf Minuten später wurde die Reaktion durch Hinzufügen von Perchlorsäure (PCA) gestoppt. Wurden noch Hemmstoffe (z.B. Metyrapon) der Inkubation zugesetzt, so geschah dies 5 Minuten vor Aminopyrin-Zugabe.

Im Unterschied hierzu wurde bei den Versuchen mit radioaktiv markiertem Aminopyrin der Zellstoffwechsel in der Regel erst 10 Minuten nach Aminopyrin-Zugabe durch Eiweißdenaturierung mittels PCA gestoppt.

2.3.3. Zellkonzentration

Die Hepatocytenkonzentration in der Inkubation entsprach bei immer gleicher Behandlung ca. 15-20 mg Trockengewicht/ml Inkubation.

2.4. Subfraktionierung mit Digitonin

Mit der Digitonin-Subfraktionierungs-Methode nach Zuurendonk & Tager (8) soll die Subfraktionierung der Leberzelle in eine mitochondriale und in eine cytosolische Fraktion vorgenommen werden, und zwar innerhalb von Sekunden. Es wurde entsprechend dem leicht modifizierten Verfahren (14), wie in Abbildung 2 dargestellt, vorgegangen, mit der Ausnahme, daß die Konzentration von Digitonin von 2.0 mM auf 1.67 mM heruntersetzt werden mußte. Es wurde nämlich gefunden, daß bei dieser niedrigeren Konzentration die Qualität der Trennung verbessert werden konnte, wahrscheinlich aufgrund eines niedrigeren Cholesteringehaltes der Leberzellplasmamembran Phenobarbital-vorbehandelter Ratten. Vergleicht man Kontrolltiere mit Phenobarbital-vorbehandelten Ratten (5 Tage Phenobarbital), so sind die Membranen des Endoplasmatischen Retikulum einem Abfall des Verhältnisses zwischen dem Cholesterin- und dem Gesamtlipidgehalt auf 73% unterworfen (15).

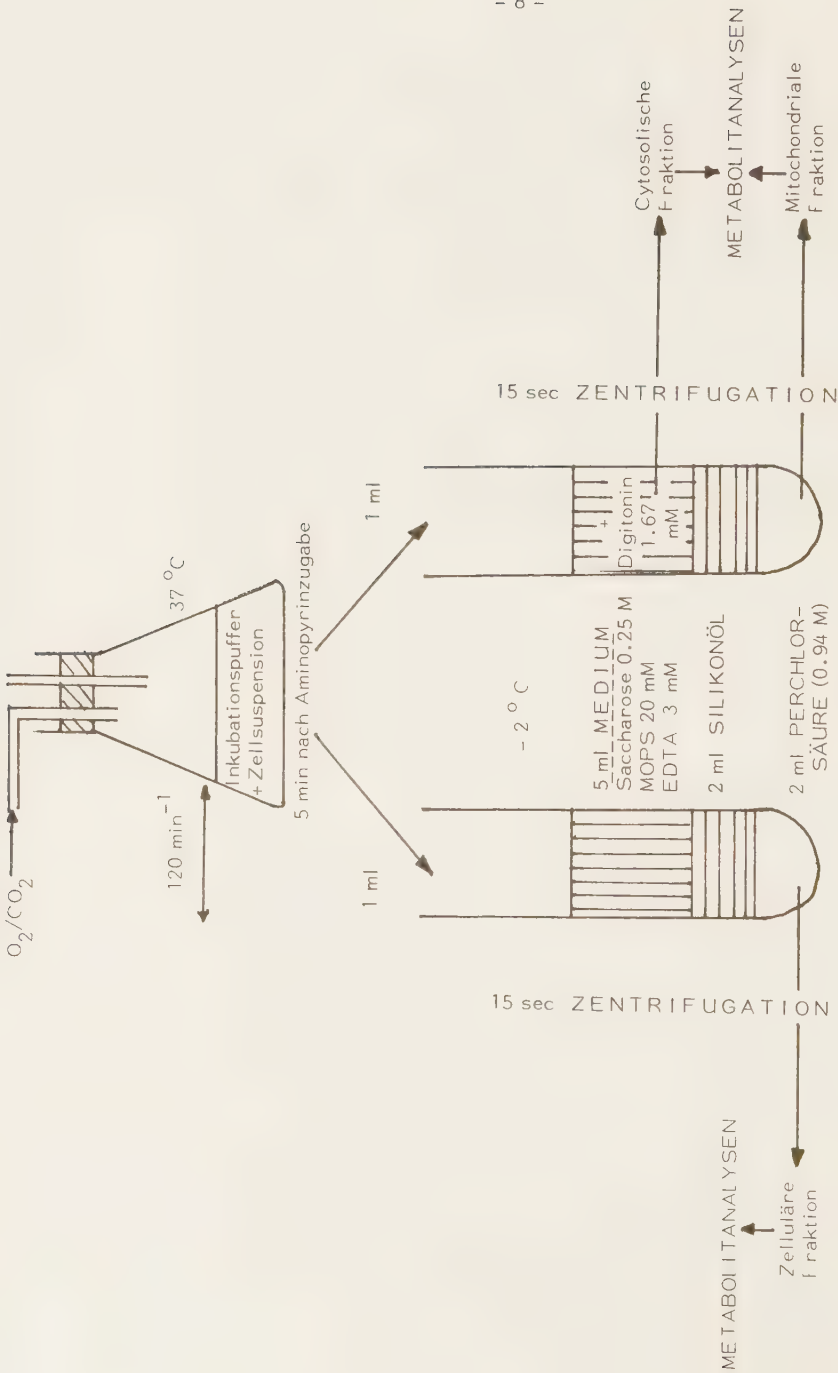


ABBILDUNG 2: Die DIGITONIN-SUBFRAKTIONIERUNGSMETHODE (8, 14) zur Messung der Metabolitkonzentrationen (Isocitrat, Citrat, 4-Ketoglutarat) in den Zellkompartimenten Cytosol und Mitochondrien sowie in der gesamten Zelle. Einzelheiten siehe Text und Literatur.

Die sog. zelluläre Fraktion (Abb. 2) erhielt man durch Zentrifugation eines Milliliters der Zellinkubation in einem mit verschiedenen Phasen geschichteten Röhrchen. Hierbei kamen die Zellen in ein Medium aus Saccharose (0.25 M), MOPS* (20 mM) und EDTA (3 mM) bei pH 7.0 und -2°C . Zellen plus Medium lagen auf einem Silikonöl-Polster der Zusammensetzung (Wacker Chemie AR 200 / General Electric SF 96-100, 8/1, v/v). Beim Zentrifugationsvorgang, der etwa 30 Sekunden in Anspruch nahm, fielen die intakten Zellen aufgrund der Zentrifugalkraft durch die Silikonölschicht hindurch in eine Perchlorsäure-Lösung (0.94 M) und wurden dort denaturiert.

Die sog. mitochondriale Fraktion wurde auf ähnliche Weise erhalten, nur daß hier das Medium Digitonin (1.67 mM) enthielt (Abb. 2), das die Plasmamembran aufschließen sollte. Durch die Zentrifugation kamen die mitochondrialen Strukturen durch das Öl in die unten sich befindende Perchlorsäure, während im Überstand (Medium plus Digitonin) die sog. cytosolische Fraktion zurückblieb. Diese mußte schnellstens abgehoben und in Perchlorsäure gebracht werden, um die Reaktionen zu stoppen.

Die Qualität der mit dieser Methode erhaltenen Subfraktionen wurde immer mittels Marker-Enzymen überprüft. So diente die Lactatdehydrogenase (LDH) als Marker des Cytosols und die Glutamatdehydrogenase (GIDH) als Marker der mitochondrialen Matrix.

2.5. Ermittlung des Trockengewichts der Hepatocyten

Zellinkubationen wurden in Doppelproben über einen Zeitraum von 3 Tagen bei ca. 70°C getrocknet. Das Gewicht der in den jeweiligen Medien enthaltenen Salze und Substrate wurde hiervon abgezogen. Ferner ging in die Berechnung die Ermittlung des Salzgehaltes der Zellstammuspension ein. Dazu war eine Hepatokrit-Bestimmung (entsprechend der Hämatokrit-Bestimmung mittels Kapillarröhrchen) zur Feststellung des Flüssigkeitsanteils der Suspension notwendig.

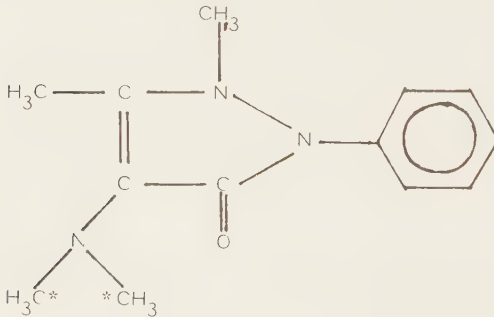
*MOPS = 3-(N-morpholino)propan Sulfonat

2.6. Bestimmung der N-Demethylierungsgeschwindigkeit des
(Dimethylamino-¹⁴C) Aminopyrin

2.6.1. Aktivität und Struktur des Aminopyrin

(Dimethylamino-¹⁴C) Aminopyrin (Abb. 3), 12 Ci/Mol, wurde mit unmarkiertem "kaltem" Aminopyrin (Pyramidon^R) vermischt und als Monooxygenase-Substrat in der Endkonzentration von 1 mM mit einer spezifischen Aktivität von 0.06 Ci/Mol in der Inkubation verwendet.

ABBILDUNG 3: STRUKTUR des Aminopyrins (Dimethylaminoanti-
pyrin, Aminophenazon), MG 231, und Lokalisation seiner
markierten Methylgruppen (*).



2.6.2. Inkubationsablauf

Die Inkubationen wurden in 25 ml fassenden, konisch zulaufenden Gläsern mit Schraubverschluß und einem im Inneren am Glasboden eingeschmolzenen Zentralgefäß durchgeführt. Der Schraubverschluß hatte als obere Abdeckung eine dicht abschließende Gummimembran, durch die hindurch man mit einer Kanüle die verschiedenen Lösungen in die Zellinkubation injizieren konnte, ohne einen Verlust an flüchtigem radioaktiven CO₂ zu haben. Der Verschluß wurde immer unmittelbar nach Aminopyrin (AP)-Zugabe zugeschraubt. Um die Reaktionsabläufe in der Zellin-

kubation 10 Minuten nach AP-Zugabe zu stoppen, war es notwendig, Perchlorsäure (PCA: 0.2 ml /ml Inkubation, 1.88 M) durch die Gummimembran in die Zellsuspension zu injizieren. Auf gleiche Weise mußte jetzt nach der Enteiweißung 1 ml 4 N NaOH in das Zentralgefäß eingebracht werden, damit das frei werdende CO_2 in die Natronlauge diffundieren konnte.

2.6.3. Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Aktivität

Nachdem die Inkubationsgläser 20 Stunden bei Raumtemperatur gestanden hatten, wurde jeweils 0.1 ml der $^{14}\text{CO}_2$ enthaltenden NaOH-Lösung in Zählröhrchen mit 15 ml Szintillatorflüssigkeit (0.17 g 1,4-bis-2(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzen =POPOP und 3.33 g 2,5-diphenyloxazol =PPO pro Liter Toluol/Methanol (2:1,v/v)) pipettiert, und anschließend die Aktivität in einem Flüssigszintillationsspektrometer (Packard Tri-carb, Modell 2450) gezählt.

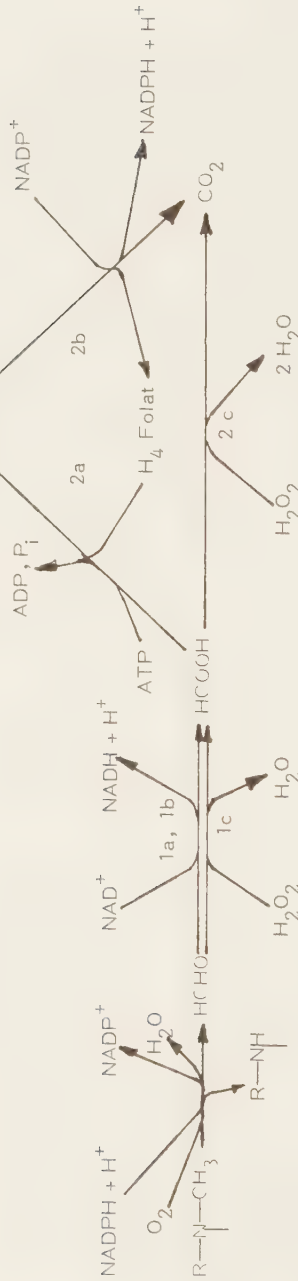
2.6.4. Indirekte Bestimmung der radioaktiven C_1 -Körper (Formaldehyd plus Formiat)

Da nur ein Teil der Produkte der N-Demethylierungsreaktion als $^{14}\text{CO}_2$ in Erscheinung tritt, müssen auch die Konzentrationen der Zwischenprodukte, nämlich Formaldehyd und Formiat, bestimmt werden (Schema 1).

Zu diesem Zweck wurde nach Brodie & Axelrod (16, 17) das Aminopyrin mit Dichloräthan ausgeschüttelt. So wurden 0.5 ml des zentrifugierten Überstandes des Perchlorsäureextraktes (mit PCA gefällte Zellinkubation) zusammen mit 0.5 ml NaOH zu 10 ml Dichloräthan in einen 50 ml fassenden Meßkolben gegeben und 5 min lang unter Verschuß in der Längsachse des Kolbens stark geschüttelt (Abb. 4).

Durch das Ausschütteln der Proben bekam man Formiat und Formaldehyd in die hydrophile Oberphase und das Aminopyrin und seine Abbauprodukte (Monomethylaminoantipyrin, Aminoantipyrin) in die Dichloräthanphase, die somit außer für die Bilanzierung keinen Zweck zu erfüllen hatte.

10-formyltetrahydrofolat



SCHEMA 1: Die N-DEMETHYLIERUNGSREAKTION an der Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenase. Es ist hier die Reaktionsfolge von der N-Demethylierung des Arzneimittels bis zur Bildung von Formaldehyd, Formiat und CO_2 stark vereinfacht dargestellt. Die dabei beteiligten Enzyme sind: 1a, Formaldehyd-Dehydrogenase (GSH); 1b, Aldehyd-Dehydrogenase; 1c, Katalase; 2a, 10-Formyltetrahydrofolat-Synthetase; 2b, 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase; 2c, Katalase.

In den Vorversuchen konnte 99 % des ausgeschüttelten (Dimethylamino- ^{14}C) Aminopyrin in der Dichloräthanphase wiedergefunden werden. Das gleiche Ergebnis erbrachte der Schüttelversuch mit ^{14}C -Formaldehyd bzw. ^{14}C -Formiat; hierbei wurden ebenfalls 99 % der eingesetzten Aktivität gemessen, aber in der Oberphase.

Aufgrund der Erfahrung aus den Testversuchen mußte bei den eigentlichen Experimenten 10 % der in der Oberphase gefundenen Aktivität abgezogen werden, um die Kontamination mit Aminopyrin aus der Unterphase auszugleichen. Dieser statistisch gesicherte Erfahrungswert wurde von Versuch zu Versuch übernommen und zwischendurch überprüft (durch mehrmalige Schüttelvorgänge).

Auf ähnliche Weise wurde mit der in der Pelletfraktion (Abb.4) verbliebenen Aktivität verfahren. Die Pelletfraktion wurde durch Zentrifugation des Perchlorsäureextraktes und nach Abheben des Überstandes erhalten. Diese Pellets wurden dreimal mit je 1 ml H_2O gewaschen und anschließend die Aktivität der Waschlösung bestimmt. Dieser Arbeitsvorgang zur Ermittlung der in den Pellets verbliebenen Aktivität gehörte zu jedem Versuch. Aber das Ausschütteln dieser Waschlösungen mit Dichloräthan zur Bestimmung des Formiat- plus Formaldehydanteils an der Gesamtaktivität wurde nur in den Vorversuchen durchgeführt. Hier wurde nämlich gefunden, daß konstant 10 % der Pellet-Aktivität auf diese beiden N-Demethylierungsprodukte entfielen, was ungefähr 7 % des Gesamtumsatzes ausmachte und bei der Auswertung der Experimente rechnerisch berücksichtigt wurde. Außerdem wurden bei diesen Versuchen sämtliche verwendeten Gläser mit kleinen H_2O -Mengen gespült und die Aktivität der Spülflüssigkeit bestimmt. Auch hier entfiel ein 10 %iger Aktivitätsanteil auf Formiat plus Formaldehyd. Diese Aktivitäten, bezogen auf den Gesamtumsatz, waren jedoch gering, wurden aber berücksichtigt.

Die Bilanzierung der eingesetzten Aktivität in Form von (Dimethylamino- ^{14}C) Aminopyrin und der wiedergefundenen Aktivität

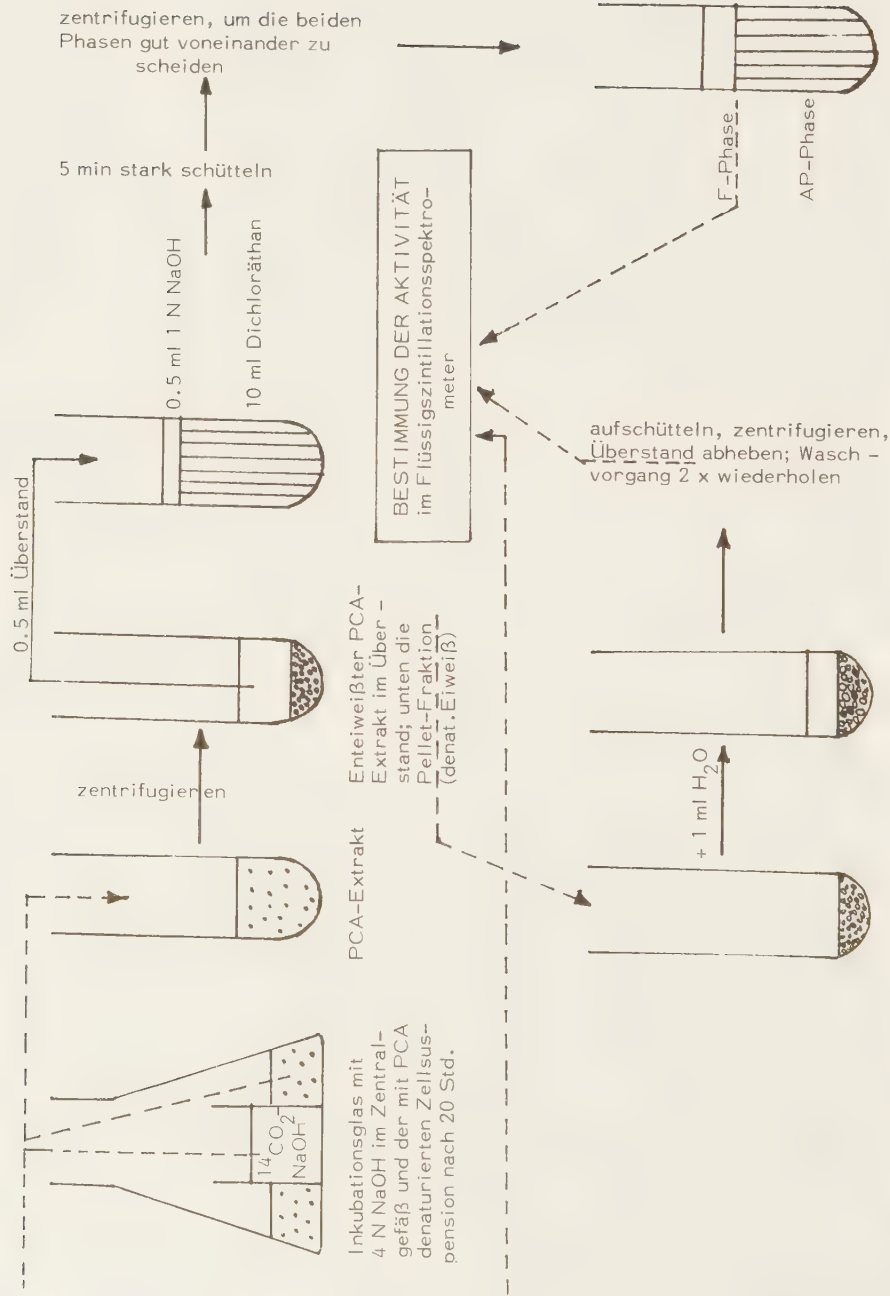


ABBILDUNG 4: Arbeitsschema zur Bestimmung der N-Demethylierungsgeschwindigkeit von (Dimethylamino-¹⁴C)Aminopyrin. Der Ge-omtumsatz wird aus der Zählung der Aktivität von ¹⁴CO₂ (aus der NaOH-Lösung) und der "F"-Phase (= ¹⁴C-Formaldehyd) ermittelt. Die AP-Phase (= nicht demethyliertes Aminopyrin) wird nur zur Bilanzierung der im Versuch verwendeten Aktivität herangezogen. Von der in der Waschlösung der Pellets gemessenen Aktivität werden 10 % der "F"-Aktivität zugeschlagen. Einzelheiten siehe Text.

in Form der N-Demethylierungsprodukte (CO_2 , Formiat, Formaldehyd) und des nicht demethylierten Aminopyrin oder nur zum Teil demethylierten (Monomethylaminoantipyrin) erbrachte eine 99 %ige Wiederfindung.

2.6.5. Direkte Bestimmung von Formaldehyd und Formiat aus dem neutralisierten Perchlorsäureextrakt

Formaldehyd wurde nach der Methode von Nash (18) bestimmt. Hierzu mußte 1.3 ml Nash-Reagenz (2 M Ammoniumacetat, 0.05M Essigsäure und 0.02 M Acetylaceton) zusammen mit 0.2ml Probe (neutralisierter Überstand des Perchlorsäureextraktes) 15 min bei 56°C inkubiert werden. Anschließend wurde die Bildung von 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin (DDL) bei 412 nm gegenüber dem Nash-Reagenz-Leerwert gemessen (molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon=8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Die Bestimmung von Formaldehyd nach Nash (18) wurde in Gegenwart der Transaminasen-Hemmstoffe Aminoxyacetat (AOA) und Cycloserin (CS) gestört, die Extinktion bei 412 nm ging auf 57 % bei AOA bzw. 30 % bei CS zurück; Messungen mit diesen Hemmstoffen wurden daher nicht mit dieser Methode durchgeführt (Tabelle 2).

TABELLE 2: Störung der Formaldehydbestimmung nach Nash (18) in Gegenwart der Transaminasen-Inhibitoren Aminoxyacetat (AOA) und Cycloserin (CS). Die Kontrolle war eine Testlösung aus Inkubationspuffer und Formaldehyd ($126 \mu\text{M}$). Diesen Proben wurde dann AOA (0.5 mM) bzw. CS (0.5 mM) zugesetzt.

	MESSUNGEN n=2	%
	<u>$\mu\text{Mol HCHO}$</u>	
Kontrolle	123	100
+ AOA	70	57
+ CS	37	30

Formiat wurde im enzymatischen Test, modifiziert nach (19), bestimmt.

100 μ l	Probe, neutralisiert auf pH 6.8
1000 μ l	Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7.5)
20 μ l	NAD-Lithiumsalz (92 mM)
20 μ l	Formiatdehydrogenase 0.7 Einheiten

2.6.6. Einheit der N-Demethylierung

Die Bestimmung der N-Demethylierungsgeschwindigkeit des (Dimethylamino- ^{14}C) Aminopyrin errechnete sich aus der Summe der Aktivitäten von $^{14}\text{CO}_2$ und ^{14}C -Formaldehyd plus ^{14}C -Formiat.

Die Werte werden in $\mu\text{Mol } ^{14}\text{CH}_3 \times \text{min}^{-1} \times \text{g (Trockengewicht)}^{-1}$ angegeben. Wie Abbildung 3 zeigt, entsprechen hierbei 2 Mol CH_3 einem Mol Aminopyrin.

2.7. Photometrische Analysen

Die Bestimmung der Metabolite Isocitrat, -Ketoglutarat, Citrat ATP, ADP, Protein usw. erfolgte im enzymatisch optischen Test in Anlehnung an (19). Die jeweiligen Metabolitkonzentrationen im enteweißten PCA-Extrakt wurden in Mikroküvetten mit folgenden Testansätzen gemessen (der Start der Reaktion erfolgte jeweils durch Enzymzugabe):

Isocitrat

200 μ l	Probe, neutralisiert auf pH 6.5 - 7.0
200 μ l	Triäthanolamin (TRA) 100 mM, pH 7.6
20 μ l	NADP 6 mM (enzymatisch 5.4 mM)
10 μ l	MnSO_4 10 mM
5 μ l	Isocitratdehydrogenase (Schweineherz), 0.005 Einh.

Citrat

50 μ l	Probe, neutralisiert auf pH 6.5 - 7.0
500 μ l	TRA-Puffer 100 mM, pH 7.6
25 μ l	Zinksulfat 5 mM
2 μ l	NADH 7 mM (enzymatisch 5.6 mM)
20 μ l	Malatdehydrogenase (MDH, Schweineherz), 14 Einh.
10 μ l	Citratlyase (Aerobacter aerogenes), 19 Einheiten

α -Ketoglutarat

50 μ l	Probe, neutralisiert auf pH 6.5-7.0
500 μ l	Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7.4
2 μ l	NADH 7 mM (enzymatisch 5.6 mM)
5 μ l	MDH 0.6 Einheiten
5 μ l	Aspartat 2.5 mM
5 μ l	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) 0.6 Einh.

ATP

100 μ l	Probe
400 μ l	Puffer (TRA 50 mM, $MgCl_2$ 50 mM, EDTA-Na 5 mM, pH 7.4)
50 μ l	Glucose 10 mM
50 μ l	NADP 6.5 mM
10 μ l	Glucose-6-P-Dehydrogenase (Hefe) 1.75 Einheiten
Nach Ablauf dieser Reaktion erfolgte der eigentliche Start mit	
10 μ l	Hexokinase (Hefe) 0.3 Einheiten

ADP

100 μ l	Probe
400 μ l	Puffer, siehe ATP
10 μ l	Phosphoenolpyruvat 5 mM
20 μ l	NADH 1.4 mM
10 μ l	Lactatdehydrogenase (Schweinemuskel) 5.5 Einheiten
10 μ l	Pyruvatkinase (Kaninchenmuskel) 0.4 Einheiten

Protein

500 μ l	NaOH 0.2 N, K-Na-Tartrat 160 mM, $CuSO_4$ 20 mM, KJ 30 mM
300 μ l	H_2O
200 μ l	Probe
Anhand einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve läßt sich aus der erhaltenen Extinktionsänderung bei 546 nm die Proteinkonzentration ermitteln.	

2.8. Reagenzien und Geräte

(Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin wurde von Radiochemical Centre, (Amersham), ^{14}C -Formiat und ^{14}C -Formaldehyd wurden von New England Nuclear (Boston) bezogen.

Das unmarkierte Aminopyrin wurde freundlicherweise von der Firma Hoechst AG (Frankfurt) zur Verfügung gestellt, ebenso Metynaron von Ciba (Basel), Rhein (4,5-Dihydroxyanthrachinon-2-Carbonsäure) von Sandoz (Basel) und SKF 525A von Smith, Kline & French (Philadelphia). Digitonin und Lubrol WX waren von der Firma Sigma (München), Aminooxyacetsäure-hemi-hydro-

chlorid von Eastman (Rochester) und D,L-Cycloserin von Regis (Chicago). Die Silikon-Öle wurden von den Firmen Wacker Chemie (Burghausen) und General Electric bezogen.

Alle sonstigen (Bio-)Chemikalien und Enzyme waren von Merck (Darmstadt) und Boehringer (Mannheim).

Die niedrigen Konzentrationen einiger Metabolite erforderten die Messung mit einem Zwei-Wellenlängen-Photometer; hierzu wurde ein Shimadzu UV 300 verwendet. Alle anderen spektral-photometrischen Messungen wurden an Geräten von Eppendorf (Modell 6114) oder Hitachi (Modell 181) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Die ATP/ADP- Quotienten und die Aktivitäten der Marker-enzyme GlDH und LDH

3.1.1. Die ATP/ADP- Quotienten

Das Verhältnis ATP zu ADP in isolierten Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten liegt um den Wert 5 (Tabelle 2). Dieser Quotient entspricht dem, der bei unbehandelten Ratten ermittelt wurde (14), das heißt, daß die Phenobarbital-Vorbehandlung keine mit dem ATP/ADP-Verhältnis meßbaren Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel der Zelle hatte. Der ATP/ADP - Quotient gilt allgemein als wichtiger Parameter für die Beurteilung des energieliefernden Stoffwechsels. Auch die Gegenwart von Aminopyrin bringt keine signifikante Änderung des ATP/ADP-Verhältnisses (Tab.2). Ähnliche Beobachtungen wurden an der perfundierten Leber gemacht (20); hierbei wurde ein Verhältnis $ATP/ADP = 3.6$ bzw 3.3 für ohne bzw. mit Aminopyrin (0.5 mM) ermittelt.

Da die ATP-Generierung durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien und durch Glykolyse im Cytosol erfolgt, und die ATP-verbrauchenden Prozesse hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind, wird das ATP mittels Translokator aus den Mitochondrien transportiert. Deswegen spiegelt der Quotient der gesamten Zelle das ATP/ADP-Verhältnis des Cytosols wider.

So müssen bei der Digitonin-Subfraktionierungs-Methode die Werte für das Cytosol viel höher liegen als die der Mitochondrien, um eine ausreichend gute Trennung zu dokumentieren. Diese Bedingung ist in Tabelle 2 erfüllt, in der der ATP/ADP-Quotient in der Pellet-Fraktion (Mitochondrien) ca. 1.1 beträgt und der im Überstand (Cytosol) um 8 liegt. Der mitochondriale Quotient liegt hier etwas niedriger als bei Zuurendonk & Tager (8), aber höher als bei Soboll, Scholz & Heldt (21), die eine andere Subfraktionierungstechnik verwendeten und mitochondriale Quotienten über 0.7 als Artefakte diskutieren.

TABELLE 2: ATP/ADP-VERHÄLTNISSE in isolierten Hepatocyten der männlichen gefütterten mit Phenobarbital vorbehandelten Ratte. (Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes wiedergegeben, die Anzahl der Beobachtungen sind in Klammern).

FRAKTION	ATP/ADP	
	Kontrolle	mit 1mM Aminopyrin
Gesamt	5.18 $\pm$ 0.29 (15)	5.00 $\pm$ 0.22 (15)
Mitochondrial (Pellet)	1.10 $\pm$ 0.07 (4)	1.07 $\pm$ 0.07 (4)
Cytosolisch (Überstand)	8.0 (2)	8.0 (2)

3.1.2. Die Marker-Enzyme LDH und GIDH bei der Subfraktionierung mit Digitonin (Tab.3)

Hierzu werden die Aktivitäten von LDH und GIDH im Überstand (extrazelluläre Fraktion) bestimmt. Bei den nicht mit Digitonin behandelten Zellen sind 9.9 % der LDH-Aktivität und 8 % der GIDH extrazellulär zu finden, in Gegenwart von 1 mM Aminopyrin bleibt die extrazelluläre LDH-Aktivität unverändert und bei der GIDH sind 6.6 % ihrer Aktivität außerhalb der Zelle.

Bei den mit Digitonin behandelten Zellen werden die Aktivitäten der beiden Marker-Enzyme in der cytosolischen Fraktion bestimmt. Nach der Subfraktionierung sind 76.8 % der LDH-Aktivität und 18.8 % der der GIDH im Cytosol zu finden. In Gegenwart von Aminopyrin sind 89.5 % der LDH nach der Digitonin-Behandlung in der cytosolischen Fraktion vorhanden, während die GIDH zu 22.1 % aus den Mitochondrien ausgetreten ist. Dieser Wert ist aber im Vergleich zu Kontrollratten, die nicht mit Phenobarbital vorbehandelt wurden, etwas höher (14).

TABELLE 3: Bestimmung der Aktivität der Marker-Enzyme (LDH, GLDH) in der extrazellulären und in der cytosolischen Fraktion (jeweils die Überstände in Abb.2) unbehandelter und mit Digitonin behandelter Hepatocyten. Die Ratten wurden 3 Tage mit Phenobarbital vorbehandelt. (Die Werte sind Mittelwerte - Standardfehler des Mittelwertes; 5-7 Beobachtungen).

ENZYM	ZUGABE	AKTIVITÄT IM ÜBERSTAND	
		unbehandelte Zellen (extra-zelluläre Fraktion)	mit Digitonin behandelte Zellen (cytosolische Fraktion)
% der Gesamtaktivität			
LDH	--	9.9 ± 1.0	76.8 ± 1.6
	Aminopyrin 1 mM	9.9 ± 0.5	89.5 ± 2.5
GLDH	--	8.0 ± 1.7	18.8 ± 2.5
	Aminopyrin 1 mM	6.6 ± 0.8	22.1 ± 3.9

3.2. Bildung der C₁-Körper (CO₂, Formiat, Formaldehyd) aus Aminopyrin

Wie in Tabelle 4 dargestellt, tritt das als ¹⁴CO₂ gefundene Demethylierungsprodukt der markierten Methylgruppe des Aminopyrins nur mit einem Anteil von 21 % am Gesamtumsatz auf, wenn das Inkubationsmedium nur aus dem Inkubationspuffer besteht. Der Anteil der gefundenen CO₂-Aktivität steigt aber in Gegenwart von L-Methionin (0.2 mM) auf 41 % an, wobei aber der Gesamtumsatz unverändert bleibt. Methionin in höheren Konzentrationen (z.B. 0.5 und 1 mM, in der Tabelle nicht aufgeführt) bringt keinen weiteren Anstieg des CO₂-Anteils.

In den Hepatocyten gefasteter Ratten, die nur in einer Krebs-Henseleit-Lösung (siehe 2.3.1.) inkubiert wurden, ist der Anteil der als ¹⁴CO₂ wiedergefundenen Aktivität ohne Methioninzusatz schon hoch, so daß hier eine Methioninzugabe keinen Effekt bringt (Tabelle 4). Eine Erklärung hierfür steht noch aus.

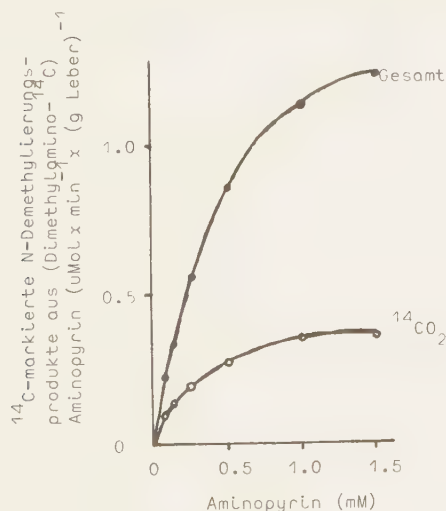
TABELLE 4: $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin in isolierten Rattenhepatocyten. Die Zellen (ca. 16 mg Trockengewicht pro ml) wurden bei 37°C 10 min lang in den jeweiligen Inkubationsmedien (siehe 2.3.1.) inkubiert. Nach den 10 min wurde 1 mM Aminopyrin in die Inkubation gegeben, und nach weiteren 10 min wurden die Reaktionen mit Perchlorsäure gestoppt. Wie schon angegeben, war das Methionin (0.2 mM) bereits zum Zeitpunkt Null in der Inkubation. Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes; die Anzahl der Beobachtungen ist dahinter in Klammern angegeben.

VORBEHANDLUNG	ZUGABE	$^{14}\text{CO}_2$ -BILDUNG	N-DEMETHYLIERUNG VON AMINOPYRIN	$^{14}\text{CO}_2$ -BILDUNGSGESCHWINDIGKEIT	
				N-DEMETHYLIERUNGSGESCHWINDIGKEIT	
$\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Hepatocyten-Trock.gew})^{-1}$					
<u>PHENOBARBITAL</u>					
gefüttert	---	0.29 $\pm$ 0.04 (13)	1.37 $\pm$ 0.12 (13)		0.21
	Methionin	0.54 $\pm$ 0.05 (13)	1.31 $\pm$ 0.11 (13)		0.41
gefastet	---	0.46 $\pm$ 0.04 (4)	1.20 $\pm$ 0.04 (4)		0.38
	Methionin	0.47 $\pm$ 0.04 (5)	1.20 $\pm$ 0.05 (5)		0.30
<u>KONTROLLE</u>					
gefüttert	---	0.10 $\pm$ 0.01 (4)	0.59 $\pm$ 0.03 (4)		0.16
	Methionin	0.22 $\pm$ 0.04 (4)	0.57 $\pm$ 0.03 (4)		0.39
gefastet	---	0.25 $\pm$ 0.02 (4)	0.75 $\pm$ 0.04 (4)		0.33
	Methionin	0.28 $\pm$ 0.02 (6)	0.75 $\pm$ 0.01 (6)		0.37

Gleiches gilt für Hepatocyten von Kontrollratten (ohne Pheno-
barbital-Vorbehandlung), bei denen jedoch die Gesamt-N-Demethylierung niedriger ist, was dafür spricht, daß eine annähernd konstante Menge an freigesetztem Formaldehyd in CO_2 unter gegebenen Bedingungen überführt wird.

Abbildung 4 zeigt die Beziehung zwischen der N-Demethylierungsgeschwindigkeit (in Abhängigkeit von der Aminopyrinkonzentration) und der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildungsgeschwindigkeit. Wie aus den beiden Kurven zu entnehmen ist, ist bei Aminopyrinkonzentrationen über 1 mM keine weitere Steigerung der CO_2 -Produktion möglich, während die gesamte N-Demethylierung immer noch leicht ansteigt.

ABBILDUNG 4: Die Konzentrationsabhängigkeit der Aminopyrin-N-Demethylierungsgeschwindigkeit (gesamte N-Demethylierung) und der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildungsgeschwindigkeit aus (Dimethylamino- ^{14}C) Aminopyrin in isolierten Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten. Die Werte sind Trockengewichtsangaben.



Eine Erklärung für den Methionin-Effekt geben Untersuchungen im Rahmen des Histidinstoffwechsels (13,22), bei denen nach Methioninzugabe (0.1 – 0.2 mM) ein auffälliger Anstieg der Formiatoxidation beobachtet wurde, was mit einem Konzentrationsanstieg an 10-Formyltetrahydrofolat und dadurch mit einer erhöhten Aktivität der 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase zusammenhängt (22,23).

In weiteren Versuchen (8 Zellinkubationen von 4 Phenobarbital-vorbehandelten Ratten) wurde die Bildung von Formaldehyd und Formiat aus Aminopyrin getrennt bestimmt. So betrug die Formaldehyd-Produktion in Inkubationen ohne Methionin $9 \pm 2 \%$ und die Formiat-Bildung $60 \pm 4 \%$ der gesamten N-Demethylierung. Mit Methionin (0.2 mM) waren die entsprechenden Anteile $11 \pm 1 \%$ und $24 \pm 3 \%$ hoch. Es bleibt die Formaldehydkonzentration praktisch unverändert, während die Formiatkonzentration durch Methionin stark beeinflußt wird und, wie oben gezeigt, vermehrt zu CO_2 oxidiert wird.

Auf die weiteren Untersuchungen des Methionineffektes (25) wird hier nicht eingegangen.

3.3. Bestimmung der N-Demethylierungsgeschwindigkeiten am Cytochrom P-450: Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ und ^{14}C -(Formaldehyd plus Formiat) aus (Dimethylamino- ^{14}C) Aminopyrin

Isolierte Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten metabolisieren das Drogensubstrat Aminopyrin (1 mM) durch N-Demethylierung in einer Geschwindigkeit von $1.31 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Hepatocyten-Trockengewicht})^{-1}$ (Tabelle 5).

TABELLE 5: Die N-DEMETHYLIERUNGSGESCHWINDIGKEIT des Aminopyrin in isolierten Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten und die BEEINFLUSSUNG DER UMSATZGESCHWINDIGKEIT durch verschiedene Stoffe, und zwar bei gefütterten wie bei gefasteten Tieren.

Die Zellen (ca. 16 mg Trockengewicht pro ml) wurden 10 min bei 37°C im entsprechenden Inkubationsmedium inkubiert (siehe Material und Methodik). Anschließend wurde 1 mM Aminopyrin zugegeben und nach weiteren 10 min wurden die Stoffwechselreaktionen mit Perchlorsäure gestoppt. Die jeweiligen in der Tabelle aufgeführten Stoffe wurden 5 min vor Aminopyrinzugabe der Inkubation zugesetzt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes, die Anzahl der Beobachtungen sind in Klammern angeführt; k.B. bedeutet: keine Bestimmung durchgeführt.

ZUGABE	N-DEMETHYLIERUNGSGESCHWINDIGKEIT DES AMINOPYRIN	
	gefüttert	gefastet
	$\mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Trock.gewicht})^{-1}$	
keine Zugabe	1.31 ± 0.1 (5)	1.27 ± 0.02 (6)
Ammoniumchlorid (10 mM); Ornithin (2 mM)	1.32 ± 0.06 (3)	1.03 ± 0.03 (6)
Aminooxyacetat (0.5 mM)	1.35 ± 0.08 (3)	0.93 ± 0.02 (6)
Ammoniumchlorid (10 mM); Ornithin (2 mM) plus Aminooxyacetat (0.5 mM)	1.28 (2)	0.70 ± 0.01 (6)
DL-Cycloserin (10 mM)	k.B.	0.85 ± 0.02 (6)
Rhein (0.1 mM)	k.B.	0.71 ± 0.08 (4)

Aus dem Verhältnis des Feuchtgewichtes zum Trockengewicht von 3.7 (26) resultiert eine N-Demethylierung von $0.36 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leber Feuchtgewicht})^{-1}$. Nimmt man den theoretischen Wert von 50 mg Mikrosomenprotein pro g Hepatocyten-Feuchtgewicht, so kommt man auf $7.1 \text{ nMol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Mikrosomenprotein})^{-1}$.

Der Cytochrom-P-450-Gehalt wurde in den Inkubationen mit 385 nMol pro g Hepatocyten-Trockengewicht bestimmt, so daß der oben angegebene Wert eine Turnover-Zahl von 3.4 min^{-1} ergibt.

Diese Werte sind etwas niedriger als der bei isolierten Mikrosomen beobachtete Umsatz (27, 28), wofür möglicherweise die Tatsache verantwortlich ist, daß die Aminopyrin-Konzentration mit 1 mM submaximal lag; die $K_{0.5}$ (Aminopyrin) bei Hepatocyten beträgt im Lineweaver-Burk-Diagramm 0.6 mM, also etwas niedriger als der bei isolierten Mikrosomen ermittelte Wert von 0.8 mM (27), liegt aber über dem Wert von 0.1–0.2 mM, der für die O_2 -Aufnahme nach Aminopyrin-Zugabe in der perfundierten Leber (29) gemessen wurde.

Da die Aminopyrin-Konzentration in den in Tabelle 5 aufgeführten Experimenten um nicht mehr als 10 % während der 10minütigen Inkubation abfiel, wurde in diesen Serien die Aminopyrin-Konzentration von 1 mM gewählt, um mögliche unspezifische Effekte auf Intermediär-Metabolite durch eine höhere Aminopyrin-Konzentration zu vermeiden.

Wie Tabelle 5 zeigt, ist die N-Demethylierung von Aminopyrin in Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten sowohl bei gefütterten wie auch bei gefasteten Tieren die gleiche, obwohl das Monooxygenase-System einer sich im "Hungerzustand" befindenden Zelle allein von der mitochondrialen Bereitstellung NADPH-reduzierender Äquivalente abhängt, wie mit Hemmstoffen der mitochondrialen Atmungskette nachgewiesen werden konnte (29,30,31).

So fällt auch in Gegenwart von Ammoniumchlorid und Ornithin die N-Demethylierung von Aminopyrin in Hepatocyten gefasteter Ratten auf 81 % gegenüber der gefasteten Kontrolle ab, während die Leberzellen gefütterter Ratten auf die Ammoniumchloridgebung hin unbeeinflusst blieben (Tab. 5). Da die Harnstoffsynthese aus Ammoniak ein Prozeß ist, der mitochondriales NADPH (32)

braucht, und die Geschwindigkeit der Harnstoffbildung aus Ammoniumchlorid in Gegenwart von Ornithin bei Hepatocyten gefasteter Ratten $1.8 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Feuchtgewicht})^{-1}$ beträgt (33), was ca. $6.7 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Trockengewicht})^{-1}$ entspricht und um das 5-fache höher liegt als die Geschwindigkeit der N-Demethylierung, kann (muß) die verminderte N-Demethylierung in Gegenwart von Ammoniumchlorid als Ergebnis der Konkurrenz um reduzierende Äquivalente gesehen werden (Schema 2).

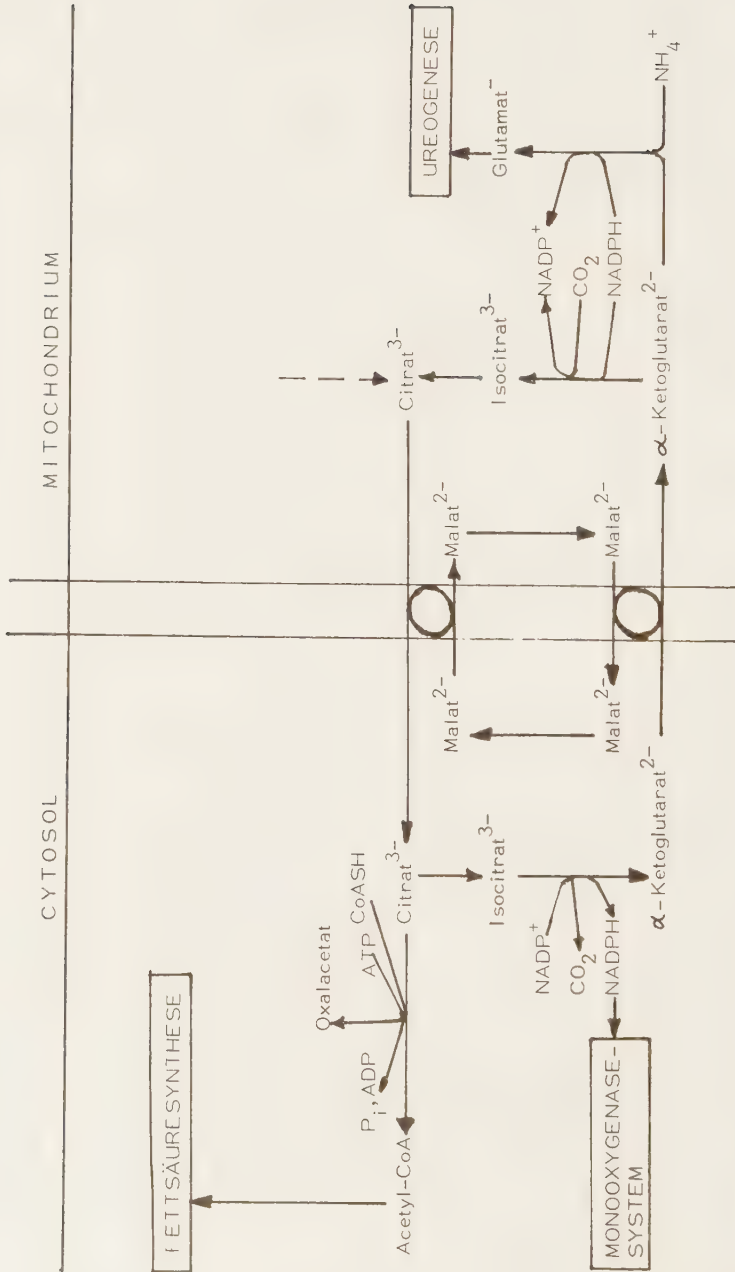
3.4. Metabolitgehalte bei der N-Demethylierung von Aminopyrin

In den Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter gefütterter Ratten treten in Gegenwart von Aminopyrin Veränderungen in den Metabolitgehalten der Tricarboxylate (Citrat, Isocitrat) und des α -Ketoglutarats auf (Tabelle 6). So fällt das zelluläre Verhältnis von Citrat zu α -Ketoglutarat auf 55 % gegenüber der Kontrolle (ohne Aminopyrin) ab.

Andere Drogensubstrate wie Äthylmorphin (1 mM) und Na-Hexobarbital (0.5 mM) führen zu einem ähnlichen Abfall des Citrat/ α -Ketoglutarat-Quotienten auf $54 \% \pm 6$ (n=4) gegenüber den Kontrollen.

In Gegenwart von Monooxygenase-Hemmstoffen ist dieser Effekt weitgehend unterdrückt. In Gegenwart von Metyrapon (150 nMol/ml) ist der Quotient Citrat/ α -Ketoglutarat auf 87 % und mit SKF 525A (100 nMol/ml) auf nur 91 % im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Dieses Verhältnis ist aber bereits vor Aminopyrinzugabe in Gegenwart des jeweiligen Monooxygenase-Inhibitors um 15-20 % niedriger als der Kontrollwert, so daß die Veränderungen in den Metabolitgehalten (Citrat, Isocitrat und α -Ketoglutarat) allein auf den N-Demethylierungsvorgang zurückzuführen sind.

Weiteren Aufschluß über die Metabolit-Veränderungen erhält man mit der Digitonin-Subfraktionierungs-Methode. Wie Tabelle 6 zeigt, fällt in Gegenwart von Aminopyrin der Citrat Spiegel ab und der des α -Ketoglutarat steigt an, und zwar sowohl in der



SCHEMA 2: Die Bereitstellung von mitochondrialem NADPH in Form reduzierender Äquivalente und deren Transfer in das Cytosol (entsprechend den Vorschlägen von (36, 37)). Der Protonentransfer aus den Mitochondrien in das Cytosol wird durch die Protonenpumpe des Monooxygenase-Systems kompensiert. Beziehungen zum Intermediär-Stoffwechsel sind angedeutet: Die Ureogenese aus Ammoniak soll die Konkurrenz um mitochondriales NADPH, das für die reduktive Amination des α-Ketoglutarat notwendig ist, zeigen und die Fettsäure-Synthese in der Reaktion der ATP-Cytridylase die Konkurrenz um cytosolischen Citrat.

TABELLE 6: DIE KONZENTRATIONEN VON CITRAT, ISOCITRAT UND -KETOGUTARAT IN ISOLIERTEN HEPATOCYTEN PHENO-BARBITAL-VORBEHANDELTEN GEFÜTTERTE RATEN IN ABWESENHEIT UND IN SEGENWART (5 min) VON AMINOPYRIN (1 mM). Die Werte der zellulären und mitochondrialen Fraktion wurden, wie in 2.4. beschrieben, erhalten, während die cytosolische Fraktion aus der Differenz der zellulären und der mitochondrialen Fraktion berechnet wurde. Die Redoxpotentiale wurden mit einem $E_0 = -433$ mV berechnet (14); hierbei wurde für die Isocitratdehydrogenase eine konstante CO_2 -Konzentration von 1.2 mM und für die Aconitohydroxylase ein Citrat/Isocitrat - Verhältnis von etwa 20 angenommen. Die in der Tabelle angegebenen Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (n=8).

FRAKTION	ZUGABE	CITRAT	-KETOGUTARAT	ISOCITRAT	CITRAT -KETOGUTARAT	REDOXPOTENTIAL
		nmol/g Trockengewicht				
Zellulär	---	991 ± 52	621 ± 43	52 ± 5	1.60	(- 400)
	Aminopyrin	731 ± 44	834 ± 84	27 ± 4	0.88	(- 387)
Mitochondrial	---	643 ± 38	222 ± 21	---	2.90	- 407
	Aminopyrin	537 ± 50	323 ± 22	---	1.66	- 400
Cytosolisch	---	348	399	---	0.87	- 391
	Aminopyrin	194	511	---	0.38	- 380

mitochondrialen als auch in der cytosolischen Fraktion, dabei sinkt das Verhältnis Citrat zu α -Ketoglutarat im Cytosol auf 44 % und in den Mitochondrien auf 57 % gegenüber den Kontrollen (= ohne Aminopyrin) ab.

Nimmt man ein "Fast-Gleichgewicht" von Citrat/Isocitrat = 20 an (14), das durch die Aconitat-Hydratase aufrecht erhalten wird, so ergibt sich bei der Berechnung der Redoxpotentiale für das NADP^+ -abhängige Dehydrogenase-System -407 mV für den mitochondrialen Raum und -391 mV für das Cytosol. Diese Werte steigen aber in Gegenwart von Aminopyrin auf -400 mV bzw. -380 mV. Insgesamt erhöht sich also die Differenz zwischen den jeweiligen Redoxpotentialen des freien NADPH zum Zeitpunkt der Drogenoxidation nur leicht.

3.5 . Einfluß der Transaminasen-Hemmstoffe, Aminooxyacetat (AOA) und Cycloserin (CS), auf die N-Demethylierung von Aminopyrin

Schema 2, das den Transport der NADPH-reduzierenden Äquivalente aus den Mitochondrien in das Cytosol entsprechend den Vorschlägen von Papa (36) und Hoek & Ernster (37) darstellt, beruht auf dem Austausch von Citrat gegen Malat und dem damit gekoppelten Austausch Malat gegen α -Ketoglutarat.

Die Beobachtung, daß die Transaminasen-Hemmstoffe, AOA und CS, sich hemmend auf die N-Demethylierung von Aminopyrin auswirken, kam deshalb unerwartet (38, 39). So ist die N-Demethylierungsgeschwindigkeit in Hepatocyten gefasteten Ratten in Gegenwart von AOA auf 73 % und bei CS auf 67 % reduziert (Tabelle 5), das bedeutet, daß die Transaminasen entscheidend am NADPH regenerierenden System beteiligt sind.

Die beiden Substanzen, AOA und CS, wirken in den Hepatocyten durch Hemmung mitochondrialer und cytosolischer Transaminasen (40), wobei Cycloserin fast ausschließlich die cytosolischen Transaminasen hemmt, da es nur schlecht die Mitochondrien-

membran durchdringen kann (41). Eine partielle Hemmung der mitochondrialen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) ist nur nach einer längeren Inkubationsdauer festgestellt worden (42).

Eine 45 %ige Hemmung der N-Demethylierung wurde mit AOA in Gegenwart von Ammoniumchlorid plus Ornithin erzielt (Tab.5), hierbei wurde der gesamte NADPH-Verbrauch erhöht (N-De-methylierung plus Harnstoffsynthese aus Ammoniumchlorid) und die Beteiligung der Transaminasen am Transport NADPH-reduzierender Äquivalente durch AOA gestört, was schließlich zur größten erreichbaren Hemmung der Drogenoxidation führte.

In Kontrollexperimenten wurde sichergestellt, daß die N-Demethylierungsgeschwindigkeit von Aminopyrin bei isolierten KCl-gewaschenen Mikrosomenpräparationen mit zugesetztem NADPH regenerierenden System durch die Gegenwart von AOA (0.5 mM) und CS (10 mM) nicht gehemmt wird. Das heißt nun, daß diese beiden Transaminasen-Hemmstoffe nicht das Monooxygenase-System beeinflussen, sondern die NADPH-Bereitstellung für dieses System.

3.6. Einfluß von Rhein auf die N-Demethylierung von Aminopyrin

Wie schon in Bild 1 angedeutet, besteht die Möglichkeit, daß die energieabhängige Transhydrogenase durch die Wasserstoffübertragung von NADH auf NADP^+ das mitochondriale NAD(H)-System mit dem bei der Drogenoxidation oxidierten NADP(H)-System über die NADPH-reduzierenden Äquivalente verbindet.

Eine Hemmung der energieabhängigen Transhydrogenase durch 0.1 mM Rhein (4,5-Dihydroxy-anthrachinon-2-Carbonsäure) wurde an isolierten Mitochondrien beobachtet (43, 44, 45).

Wie Tabelle 5 zeigt, tritt in Gegenwart von 0.1 mM Rhein eine fast 50 %ige Hemmung der N-Demethylierung von (Dimethylamino- ^{14}C)Aminopyrin bei gehungerten Phenobarbital-vorbehandelten Ratten auf, was für eine Beteiligung der energieabhängigen Trans-

hydrogenase an der NADPH-Bereitstellung in Form von reduzierenden Äquivalenten spricht.

Ein ähnliches Ergebnis erbrachte die 70 %ige Hemmung der Harnstoffsynthese aus Ammoniak durch Rhein (32).

4. DISKUSSION.

4.1. Wahl des Monooxygenase-Substrates

In vorliegender Studie, in der das Transportsystem NADPH reduzierender Äquivalente an der intakten Leberzelle untersucht wurde, sollte das Drogensubstrat bestimmte Bedingungen erfüllen; es sollte

- (a) eine möglichst hohe Umsatzgeschwindigkeit am Monooxygenase-System haben, um einen hohen NADPH-Verbrauch zu gewährleisten
- (b) der gesteigerte NADPH-Verbrauch nur durch die Drogenoxidation bedingt sein dürfen
- (c) keine Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung bestehen.

Diesen Bedingungen am nächsten kamen Aminopyrin und Äthylmorphin. Nur hatte Äthylmorphin den Nachteil, daß es nur Trätmittelmarkiert erhältlich war.

Die Verwendung von Drogensubstraten, deren Dealkylierungsprodukte einer photometrischen oder fluorimetrischen Analyse zugänglich sind, wie z.B. p-Nitroanisol und 7-Äthoxycoumarin, erschien nicht ratsam, da bei p-Nitroanisol als Produkt p-Nitrophenol entsteht, das einen Abfall des ATP/ADP-Quotienten verursacht, der wahrscheinlich durch einen Entkopplungs-Effekt bedingt ist (46), während 7-Äthoxycoumarin in einer zu geringen Geschwindigkeit oxidiert wird (47) und somit auch ungeeignet ist.

Da die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Barbiturate bekannt ist, wurde auch auf die Verwendung von Hexobarbital als Monooxygenase-Substrat verzichtet.

Alprenolol (1-2-allyl-phenoxy)-3-isopropylaminopropanol) wäre ähnlich dem Aminopyrin zu verwenden gewesen, doch ist diese Substanz hinsichtlich seiner Eigenschaften in Gegenwart von Hepatocyten noch nicht ausreichend untersucht. Außerdem streuen die beobachteten Umsatzgeschwindigkeiten mit 20 - 75 μM

Alprenolol zu sehr und sind im Vergleich zu denen mit Aminopyrin gemessenen zu niedrig (31).

So erschien Aminopyrin als Monooxygenase-Substrat am geeignetsten: es hat eine ausreichend hohe N-Demethylierungsgeschwindigkeit und, wie in Tabelle 2 mit der Bestimmung des ATP/ADP-Quotienten gezeigt wurde, praktisch keine Beeinflussung des Energiestoffwechsels.

4.2. Auswirkungen der Drogenoxidation auf NADPH und NADP^+

Die Drogenoxidation ist an der intakten Leber mit einem Abfall des NADPH-Gehalts und einem gleichzeitigen Anstieg der NADP^+ -Konzentration verbunden, wie es an der perfundierten Leber Phenobarbital-vorbehandelter Ratten (30, 48) und auch an isolierten Hepatocyten (31, 38) nachgewiesen werden konnte.

So kann das Gleichgewicht zwischen NADPH-Verbrauch und NADPH-Regenerierung nur durch einen verstärkt oxidierten Redoxzustand des Pyridinnukleotids aufrecht erhalten werden. In der perfundierten Leber fällt in Gegenwart von Hexobarbital als Monooxygenase-Substrat das NADPH/ NADP^+ -Verhältnis von 4.0 auf 2.3 ab (30). Die Umkehrbarkeit dieses Effekts läßt sich durch Registrierung der NADPH-Absorption über einem perfundierten Leberlappen mittels Organspektrophotometrie direkt beobachten, wenn die Absorptionsänderung nach Absetzen des Monooxygenase-Substrates wieder auf den Ausgangspunkt zurückkehrt (30). Ebenso geht die bei der Drogenoxidation erhöhte O_2 -Aufnahme nach Ablauf der Reaktion wieder auf das anfängliche Fließgleichgewicht zurück (49).

Das Verhältnis der Gesamtgehalte von NADPH zu NADP^+ gibt keinen Aufschluß über das Redoxpotential dieses Coenzym. Verwendet man aber die "Indikator-Metabolit-Annäherung" (7), so hat sich gezeigt, daß das Redoxpotential des freien NADPH um etwa 10 mV positiver wird. Das zeigte sich durch einen Abfall des Malat/Pyruvat-Verhältnisses auf die Hälfte des Kontrollwertes in Gegenwart von Hexobarbital (48, 5).

Ergänzend zum Indikator-System des Malat-Enzyms wurde mit der NADP^+ -abhängigen Isocitratdehydrogenase ein weiteres System gefunden, das in isolierten Hepatocyten zu ähnlichen Ergebnissen führt (38, 50). Die in Tabelle 7 aus den Indikator-Metabolitkonzentrationen berechneten Verhältnisse von $\left[\text{NADPH}_{\text{frei}}\right]$ zu $\left[\text{NADP}^+_{\text{frei}}\right]$ sind höher als die zellulären Konzentrationsverhältnisse von $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Außerdem ist der Quotient bei den Kontrollen höher als nach Phenobarbital-Vorbehandlung und ist noch niedriger in Gegenwart eines Monooxygenase-Substrates. Das wird bei der Betrachtung der für die NADPH -Regenerierung in Frage kommenden enzymatischen Reaktionen von Interesse sein.

4.3. Mögliche enzymatische Reaktionen zur Bereitstellung von NADPH für das Monooxygenase-System

Wie Tabelle 1 zeigt, sind die Aktivitäten der vier wichtigsten Enzymsysteme, die für die Versorgung des extramitochondrialen Raumes mit NADPH in Frage kommen, viel höher als die Umsatzgeschwindigkeit am Monooxygenase-System (mit Aminopyrin als Substrat beträgt die Umsatzgeschwindigkeit etwa $0,36 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Feuchtgewicht})^{-1}$ bei 37°C). Die Hauptaktivität besitzt die Isocitratdehydrogenase, wohingegen das Malat-Enzym weniger als 10 % dieser Aktivität hat. Die beiden Dehydrogenasen des Pentosephosphat-Zyklus stellen einen Sonderfall dar, da durch ein hohes $\left[\text{NADPH}_{\text{frei}}\right] / \left[\text{NADP}^+_{\text{frei}}\right]$ -Verhältnis die NADP^+ reduzierende Reaktion gehemmt wird (51, 52). Sinkt dieses Verhältnis ab, geht die Hemmwirkung auf die Glucose-6-P-Dehydrogenase verloren. Eine Ent-hemmung geschieht ebenfalls durch Glutathiondisulfid (52), das tatsächlich in höheren Konzentrationen von der Leber in Gegenwart von Aminopyrin abgegeben wird (53) und so die Glucose-6-P-Dehydrogenase stimuliert.

Die Bedeutung der vier für die NADPH -Bereitstellung möglichen Dehydrogenasen hängt von der Geschwindigkeit des NADPH -Verbrauchs und vom jeweiligen Redoxpotential ab. So wird bei

TABELLE 7: DURCH PHENOBARBITAL-VORBEHANDLUNG UND DROGENOXIDATION BEDINGTE VERÄNDERUNGEN DES NADPH-SYSTEMS DER RATTELEBER.
Das Verhältnis von $\frac{[\text{NADPH}_{\text{frei}}]}{[\text{NADP}^+_{\text{frei}}]}$ wurde aus der Gesamtkonzentration der Indikatormetaboliten im Gewebe (Tab. 6) berechnet. Die subzellulären Redoxpotentiale des freien NADPH während der Drogenoxidation sind ebenfalls in Tab. 6 zu finden.

	KONTROLLE	MIT PHENOBARBITAL-VORBEHANDLUNG	
		ohne Zugabe	mit Drogensubstrat
<u>PERFUNDIERTE LEBER</u>			
NADPH/NADP ⁺ a)	4.8	4.0	2.3
$\frac{[\text{NADPH}_{\text{frei}}]}{[\text{NADP}^+_{\text{frei}}]}$ berechnet mit dem			
6-Phosphogluconatdehydrogenase-System ^{b)}	89	24	--
Malat-Enzym-System ^{b)}	--	51	30
<u>SOLIIERTE HEPATOCYTEN</u>			
NADPH/NADP ⁺ c)	3.8	2.0	2.1
$\frac{[\text{NADPH}_{\text{frei}}]}{[\text{NADP}^+_{\text{frei}}]}$ berechnet mit dem			
Isocitratdehydrogenase-System ^{d)}	--	72	27

- a) Sies & Brauser (30); Drogensubstrat: Hexobarbital, 0,4 mM
b) Kauffman et al. (5); Drogensubstrat: Hexobarbital, 0,1 mM
c) Moldeus et al. (31); Drogensubstrat: Alprenolol, 0,075 mM
d) Welgl & Sies (34); Drogensubstrat: Amlinoprin, 1,0 mM

niedrigen Geschwindigkeiten die Isocitratdehydrogenase den Hauptteil des NADPH bereitstellen, während bei höheren Umsatzgeschwindigkeiten des Monooxygenase-Systems die Dehydrogenasen des Pentosephosphat-Zyklus mehr und mehr NADPH zuteilen.

Busch (54) hat an der perfundierten Leber gefütterter Ratten die NADPH-Bildung im Pentosephosphat-Zyklus in Gegenwart von Aminopyrin gemessen, indem er die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus $(1-^{14}\text{C})$ Glucose bestimmt hat, und dabei eine fast verdoppelte NADPH-Bildungsgeschwindigkeit feststellte (Tabelle 8).

TABELLE 8: DIE BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT DES PENTOSEPHOSPHAT-ZYKLUS MIT DER ISOTOPEN-METHODE AN DER PERFUNDIERTEN RATTENLEBER.

Die unten angegebenen Werte wurden von Busch (54) ermittelt und zeigen die NADPH-Bildung im Pentosephosphat-Zyklus. Die Ergebnisse gewannen Busch durch Leberperfusion mit $(1-^{14}\text{C})$ Glucose und $(6-^{14}\text{C})$ Glucose, woraus er die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung im Pentosephosphat-Zyklus berechnete und -- in der Annahme, daß 2 NADPH pro CO_2 gebildet würden -- in NADPH ausdrückte.

ZUGABE	NADPH-BILDUNG IM PENTOSEPHOSPHAT-ZYKLUS	
	KONTROLLE	PHENOBARBITAL-VORBEHANDELT
	<u>$\mu\text{Mol NADPH}/\text{min pro g Leber}$</u>	
---	0.22	0.35
Aminopyrin (1 mM)	k.B.*	0.63

* K.B.= keine Bestimmung

In einem ähnlichen Experiment wurde an isolierten Hepatocyten die maximale Umsatzgeschwindigkeit des Pentosephosphat-Zyklus gemessen (55); die hierbei ermittelte NADPH-Bildung übertraf bei weitem den durch die Drogenoxidation bedingten NADPH-Verbrauch. Diese Experimente bestätigen die Bedeutung des Pentose-

phosphat-Zyklus für die NADPH-Bereitstellung bei gefütterten Ratten. Bei gefasteten Tieren aber ist das Monoxygenase-System allein von der mitochondrialen NADPH-Bereitstellung abhängig.

Durch die Beobachtung, daß das NADP^+ -abhängige Isocitratdehydrogenase-System der Mitochondrienmatrix geeignet ist, das freie NADPH-Redoxpotential in diesem Kompartiment (unter Verwendung der Digitonin-Subfraktionierungs-Methode) anzuzeigen (14), kann man somit feststellen, daß es in Gegenwart eines Drogensubstrates nicht nur im Cytosol sondern auch in den Mitochondrien zu einem positiven Anstieg des NADPH-Redoxpotentials kommt (38). Das bedeutet, daß eine direkte Beziehung zwischen den extramitochondrialen und mitochondrialen NADP^+ -abhängigen Reaktionen besteht und die jeweiligen Veränderungen über die Dicarboxylat-Tricarboxylat-Carriersysteme übertragen werden, sodaß bei gefütterten Ratten die NADPH-Bereitstellung, wie oben gesagt, durch den Pentosephosphat-Zyklus und das Isocitratdehydrogenase-System erfolgt.

4.4. Bedeutung der Konzentrationsveränderungen von Citrat, Isocitrat und α -Ketoglutarat in Mitochondrien und Cytosol

Die Beobachtung der Intermediate des Citrat-Zyklus während der Monoxygenierungsreaktion demonstriert anschaulich die "metabolische Unruhe" in den Hepatocyten gefütterter Phenobarbital-vorbehandelter Ratten (Tab. 6). Das zeigt, daß der Pentosephosphat-Zyklus nicht den Abfall der Isocitrat- und Citratkonzentration verhindern kann, zu dem es durch die extramitochondriale Isocitratdehydrogenase und Aconitathydratase gekommen ist. Zur weiteren Beurteilung des Ausmaßes der Konzentrationsveränderungen werden die Metabolitgehalte aus Tabelle 6 relativ zu ihrem jeweiligen Wasserraum (Mitochondrien bzw. Cytosol) umgerechnet (56) (Tabelle 9).

Der Konzentrationsgradient für Citrat und α -Ketoglutarat vom Mitochondrium zum Cytosol ist in Abwesenheit von Aminopyrin

TABELLE 9: AUSWIRKUNG DER AMINOPYRIN-N-DEMETHYLIERUNG AUF DIE CITRAT- UND α -KETOGLUTARAT-KONZENTRATIONEN IN MITOCHONDRIEN UND CYTOSOL, BEZOGEN ABER AUF DIE ENTSPRECHENDEN WASSERGEHALTE DER KOMPARTIMENTE.

Die Umrechnung der Konzentrationen aus Tabelle 6 relativ zu ihren subzellulären Wassergehalten erfolgte nach (36) mit den darin angegebenen Werten von 0,21 ml/g Trockengewicht für den mitochondrialen Raum und 2,0 ml/g Trockengewicht für das Cytosol. Die angegebenen Konzentrationsgradienten wurden aus dem Verhältnis mitochondrial/cytosolisch ermittelt, und die pH-Verschiebung wurde in Anlehnung an die Donnan-Beziehung berechnet. Die Aminopyrulkonzentration betrug 1 mM, die Hepatocyten waren von Phenobarbital-vorbehandelten gefütterten Ratten.

	ZUGABE	CITRAT mM	α -KETOGLUTARAT mM	<u>CITRAT</u> <u>α-KETOGLUTARAT</u>
Mitochondrial	keine	3.06	1.06	2.89
	Aminopyrin	2.56	1.54	1.66
Cytosolisch	keine	0.17	0.20	0.85
	Aminopyrin	0.10	0.26	0.38
Konzentrationsgradient mitochondrial/cytosolisch	keine	18.0	5.3	
	Aminopyrin	25.6	5.9	
pH (Mitochondrien zum Cytosol)	keine	0.42	0.36	
	Aminopyrin	0.47	0.39	

bei Phenobarbital-vorbehandelten Ratten ähnlich jenem, der bei unbehandelten Kontrollratten beobachtet wurde. Er beträgt 17.2 für Citrat und 6.6 für α -Ketoglutarat (14).

In Gegenwart von Aminopyrin (1 mM) steigt der Gradient für Citrat von 18.0 auf 25.6, beim α -Ketoglutarat ist ebenfalls ein Gradienten-Anstieg, wenn auch nur ein leichter, festzustellen (Tab. 9). Da das Ansteigen der Gradienten hauptsächlich durch den relativ größeren Effekt der Monooxygenierungs-Reaktion auf die cytosolischen Werte bedingt ist, spiegelt der Anstieg jeweils möglicherweise eine inkomplette Äquilibration der Metaboliten über die Mitochondrienmembran hinweg wider, während der Flux erhöht ist.

Es ist auch möglich, daß die erhöhten Gradienten in Gegenwart des Drogensubstrates das Ergebnis einer pH-Verschiebung zwischen Mitochondrien und Cytosol (in den Mitochondrien alkalischer) sind. Nimmt man nämlich eine komplette Äquilibration an, in Anlehnung an die Donnan-Beziehung, ergäbe sich für Citrat eine pH-Änderung von 0.42 auf 0.47 für ohne bzw. mit Aminopyrin, und für α -Ketoglutarat von 0.36 auf 0.39; diese pH-Unterschiede können aus den Konzentrationsgradienten in Tabelle 9 berechnet werden.

Der substantielle Abfall der Citratkonzentration und der gleichzeitige Anstieg des α -Ketoglutarat während der Monooxygenierungs-Reaktion haben ihre Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel.

4.5. Interaktionsmöglichkeiten zwischen dem Monooxygenase-System und einigen biosynthetischen Prozessen

Wie man in Schema 2 sieht, hat ein Abfall der Tricarboxylate eine direkte Wirkung auf die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese, und zwar dadurch, daß das Citrat quasi "umgeleitet" wird, von der ATP-Citratlyase weg. Tatsächlich haben Thurman & Scholz (20) in Gegenwart von Aminopyrin einen ca. 40 %igen Abfall des Tritiumeinbaus (aus Tritiumwasser) und des ^{14}C -Einbaus (aus ($\text{U-}^{14}\text{C}$)Glucose) in die Lipidfraktionen

beobachtet. Sie diskutierten eine direkte Konkurrenz um das NADPH zwischen den Reduktionsschritten der Lipogenese und der Monooxygenierungs-Reaktion. Diese Interpretation erscheint unwahrscheinlich, berücksichtigt man die Mittelpotentiale der jeweiligen Dehydrogenasen (57). Da die K_m (Citrat) des Tricarboxylat-Carriers für den Export aus den Mitochondrien sich in der Größenordnung von 3 – 6 mM bewegt (58), könnte eine Limitierung der Synthesegeschwindigkeit ebenso durch die Translokation bedingt sein. Außerdem ist es möglich, daß während der Monooxygenierung eine durch den Citratabfall bedingte verminderte allosterische Aktivierung der Acetyl-CoA-Carboxylase vorliegt. Eine Erklärung für die durch den Citratabfall bedingte Hemmung der Lipogenese steht noch aus.

Die Interaktion des Monooxygenase-Systems mit der Ureogenese (siehe Schema 2) ist von geringerer Bedeutung, da in Hepatocyten gefasteter Ratten die Aminopyrin-N-Demethylierung zum Zeitpunkt einer maximalen Harnstoffsynthesegeschwindigkeit aus Ammoniumchlorid nur um 18 % vermindert ist (Tab. 5) und andererseits die Ureogenese bei der maximalen N-Demethylierungsgeschwindigkeit von Aminopyrin auch nur um 15 % reduziert ist (39).

Der Prozeß der Gluconeogenese wird ebenfalls durch die Monooxygenase-Aktivität beeinflußt. So wurde in der perfundierten Leber Phenobarbital-vorbehandelter Ratten ein 45 %iger Abfall der Glucosebildung aus Laktat in Gegenwart von Aminopyrin festgestellt (59). Dieser Effekt wurde als Ablenkung des Malat von der Gluconeogenese (Malatdehydrogenase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) interpretiert, da das Malat-Enzym dem Monooxygenase-System NADPH bereitstellte. Ein Abfall des Malat/Pyruvat-Verhältnisses in Gegenwart eines Drogensubstrates wurde auch beobachtet (5, 48).

4.6. Ein Transportsystem für NADPH-reduzierende Äquivalente aus den Mitochondrien in das Cytosol

Der Stoffwechsel der Tricarboxylate, Citrat und Isocitrat, und des α -Ketoglutarat als Dicarboxylat ist mit dem Monooxygenase-System über die NADP^+ -abhängige Isocitratdehydrogenase verbunden, wie Schema 2 zeigt. Hierbei schafft der Austausch von Malat gegen Citrat und α -Ketoglutarat gegen Malat über die innere Mitochondrienmembran hinweg die Verbindung zwischen den beiden Kompartimenten (36, 37). Entsprechend wurde in Gegenwart von Aminopyrin bei Hepatocyten gefütterter Ratten ein Abfall der Citratkonzentration und ein Anstieg des α -Ketoglutarat sowohl im Cytosol als auch in den Mitochondrien festgestellt.

Da die N-Demethylierungsgeschwindigkeit in Hepatocyten gefasteter und gefütterter Ratten gleich ist, was dafür spricht, daß die Bereitstellung von NADPH-reduzierenden Äquivalenten in Form mitochondrial gebildeten Citrats tatsächlich in der Lage ist, bei der gefasteten Ratte eine maximale N-Demethylierungsgeschwindigkeit von Aminopyrin zu ermöglichen, sind deswegen die Hepatocyten gefasteter Ratten am besten geeignet, Aufschlüsse über das NADPH-Transfersystem zu erhalten.

So muß aufgrund der Beobachtung, daß in Gegenwart der Transaminase-Hemmstoffe AOA und CS die N-Demethylierungsgeschwindigkeit von Aminopyrin bei gefasteten Ratten gehemmt wird (Tab.5), Schema 2 modifiziert werden, da aufgrund dieser Beeinflussung der Drogenoxidation eine Beteiligung der GOT am Transfer-System ziemlich sicher erscheint, um den Dicarboxylaten einen schnellen Rücktransport in die Mitochondrien zu ermöglichen (Schema 3). Hierbei wird das α -Ketoglutarat, das in der Isocitratdehydrogenase-Reaktion im Cytosol gebildet wird, zuerst zu Glutamat durch die GOT transaminiert. Das Glutamat kann anschließend mit dem sehr effektiven Aspartat-Glutamat-Austausch (60) in die Mitochondrien gelangen. Das nun mitochondriale Glutamat wird wieder in α -Ketoglutarat durch Transaminierung mit Oxalacetat

überführt, das in Form des Malat über den Tricarboxylat-Carrier in die Mitochondrien gekommen und dort durch die Malatdehydrogenase unter Bildung von NADPH in Oxalacetat überführt worden ist.

Die Beteiligung der GOT ist auch insofern begründet, als eine Umsatzlimitierung des α -Ketoglutarat-Malat-Austausches durch Konkurrenz des Malat mit anderen Dicarboxylaten für den Transport in die Mitochondrien besteht und die $K_i(\text{Malat})=0.12 \text{ mM}$ ist (61). Eine Malatkonzentration in dieser Größenordnung konnte im Cytosol nachgewiesen werden (62).

4.7. Die Rolle der energieabhängigen Transhydrogenase bei der NADPH-Bereitstellung

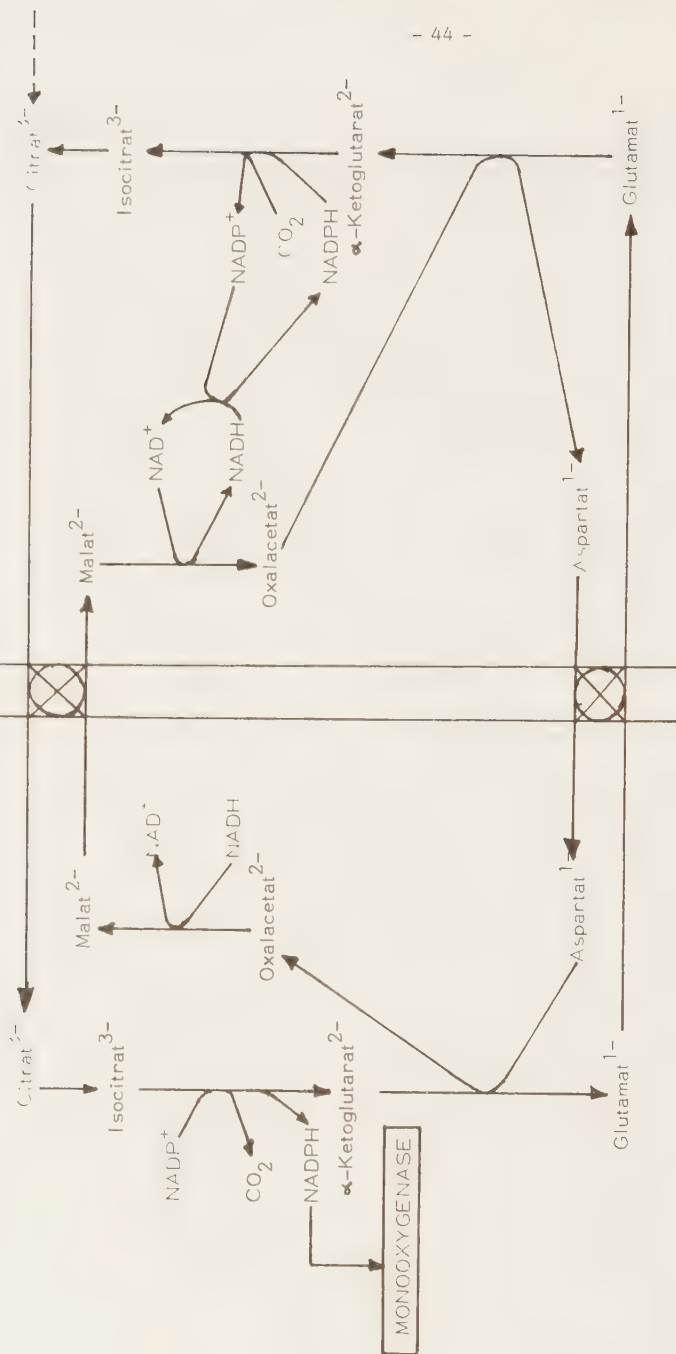
Aufgrund der von Ernster et al. (63, 64, 65, 66) beschriebenen Funktion der energieabhängigen Transhydrogenase und der in Tabelle 6 ermittelten NADPH Redoxpotentiale von -407 mV (ohne Aminopyrin) und -400 mV (mit Aminopyrin) in der Mitochondrienmatrix ist eine Beteiligung der Transhydrogenase an der Bereitstellung NADPH-reduzierender Äquivalente anzunehmen, da dieses Enzym nämlich für einen effektiven Reaktionsablauf stark negative Redoxpotentiale benötigt.

Hauptargument für eine Beteiligung aber ist die fast 50 %ige Hemmung der N-Demethylierung von Aminopyrin in Gegenwart des Transhydrogenase-Inhibitors Rhein (Tabelle 5).

So scheint es wahrscheinlich, daß die energieabhängige Transhydrogenase durch die Wasserstoffübertragung von NADH auf NADP^+ das mitochondriale NAD(H)-System (z.B. Malatdehydrogenase) mit dem NADP(H)-System der Isocitratdehydrogenase verbindet, um schließlich die Bildung von Citrat zu unterstützen (Schema 3).

CYTOSOL

MITOCHONDRIUM



SCHEMA 3: Der Transport NADPH reduzierender Äquivalente aus den Mitochondrien in das Cytosol und der Transfer der bei der Monooxygenierungsreaktion entstehenden Dicarboxylate zurück in die Mitochondrien.

Aufgrund der Ergebnisse in Tabelle 5 mußte Schema 2 modifiziert werden, da sich eine Beteiligung der Transaminasen und der energieabhängigen Transhydrogenase an der Bereitstellung NADPH reduzierender Äquivalente ergab. Dieses Schema ließe sich noch durch den Transfer NADH reduzierender Äquivalente in das Cytosol vervollständigen (67, 68).

4.8. Steigerung der Flußgeschwindigkeit im Citrat-Zyklus in Gegenwart eines Monooxygenase-Substrates

In Gegenwart eines Drogensubstrates ist eine Erhöhung der Flußgeschwindigkeit im Citrat-Zyklus zu beobachten (50); es kommt in Gegenwart von Aminopyrin zu einem reversiblen Anstieg der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus (1- ^{14}C)Octanoat an der perfundierten Leber der gefasteten Ratte. Das bedeutet, daß aufgrund des Bedarfs des Monooxygenase-Systems an NADPH-reduzierenden Äquivalenten Citrat in verstärktem Maße benötigt wird, und somit vermehrt Acetyl-CoA aus der β -Oxidation (1- ^{14}C)Octanoat) in den Citrat-Zyklus eingeschleust wird und mit der erhöhten $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung in Gegenwart von Aminopyrin den gesteigerten Flux im Citrat-Zyklus anzeigt.

Das läßt sich ebenfalls mit der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus (U- ^{14}C)-Glutamat (69) zeigen, das über α -Ketoglutarat im Citrat-Zyklus metabolisiert wird, oder aus (2- ^{14}C)Pyruvat (69), das als Endprodukt der Glykolyse über Acetyl-CoA (Pyruvatdehydrogenase-Komplex) in den Citrat-Stoffwechsel (Citrat-Synthase) gerät. Entsprechend tritt eine Erhöhung der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildungsgeschwindigkeit auch aus (6- ^{14}C)Glucose in Gegenwart von Hexobarbital bei Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten auf (55), wird aber auch an der perfundierten Leber mit Aminopyrin beobachtet (54).

Diese Versuche zeigen, daß der (mitochondriale) Stoffwechsel dem erhöhten Citratverbrauch in Gegenwart von Monooxygenase-Substraten durch gesteigerte Substratzuteilungen (z.B. Acetyl-CoA) an den Citrat-Zyklus nachkommt, und dieser damit die Flußgeschwindigkeit steigert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. An isolierten Hepatocyten Phenobarbital-vorbehandelter Ratten wurde die Stoffwechselwirkung der Cytochrom P-450-abhängigen Drogenoxidation studiert. Das Drogensubstrat (Dimethylamino-¹⁴C)Aminopyrin (1 mM) wurde am Monooxygenase-System in einer Geschwindigkeit von $1.31 \pm 0.1 \mu\text{Mol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{g Leberzellen trocken})$ N-demethyliert. Dieser Umsatz wurde an Hepatocyten gefütterter Ratten ermittelt und war dem gefasteter Ratten nahezu identisch (1.27 ± 0.02). Das Verhältnis ATP/ADP betrug in Gegenwart von Aminopyrin 5.0 und zeigte gegenüber den Kontrollen keinen wesentlichen Unterschied.
2. In Gegenwart der Drogensubstrate (Aminopyrin, Äthylmorphin, Hexobarbital) fallen in Hepatocyten gefütterter Ratten die Konzentrationen von Citrat und Isocitrat ab, während α -Ketoglutarat ansteigt; somit sinkt das Verhältnis Citrat/ α -Ketoglutarat auf 55 % gegenüber den Kontrollen ab. Diese Beobachtung zeigt eine enge Korrelation zu dem schon früher gesehenen Abfall der gesamten NADPH-Konzentration und des Verhältnisses NADPH/NADP⁺ an der perfundierten Leber. Der Citrat- bzw. Isocitrat-Abfall läßt auf eine Beteiligung der extramitochondrialen Isocitratdehydrogenase an der NADPH-Bereitstellung für das Monooxygenase-System schließen. So gelangt trotz der höheren Aktivität des Pentosephosphat-Zyklus NADPH in Form reduzierender Äquivalente aus den Mitochondrien. Daß dies auch bei gefütterten Tieren geschieht, ist ein Ergebnis der Hemmwirkung des NADPH auf die Glucose-6-P-Dehydrogenase, die dadurch die Aktivität des Pentosephosphat-Zyklus herabsetzt.
3. Die Subfraktionierung der Hepatocyten gefütterter Ratten mit der Digitonin-Methode zeigt den Abfall des Citrat/ α -Ketoglutarat-Verhältnisses sowohl in der mitochondrialen Fraktion als auch in der cytosolischen. Das hängt mit einer um 10 mV positiven Verschiebung des NADPH-Redoxpotentials (oder einem 50 %igen

Abfall des freien $\left[\text{NADPH} \right] / \left[\text{NADP}^+ \right]$) in beiden Kompartimenten zusammen.

4. In Hepatocyten gefasteter Ratten (nicht bei gefütterten) ist die N-Demethylierungsgeschwindigkeit von Aminopyrin in Gegenwart der Transaminasen-Hemmstoffe (Aminooxyacetat, Cycloserin) auf 2/3 vermindert. Das spricht für eine Beteiligung der Transaminasen am Transport NADPH-reduzierender Äquivalente, um durch die Transaminierung von α -Ketoglutarat den Dicarboxylaten einen schnellen Rücktransport zurück in die Mitochondrien zu ermöglichen und um dort wieder zu Tricarboxylaten aufgebaut zu werden. Der α -Ketoglutarat-Malat-Austausch ist wahrscheinlich aus kinetischen Gründen limitiert.
5. Unter den gleichen Bedingungen kommt es mit Rhein, einem Hemmstoff der energieabhängigen Transhydrogenase, zu einer 50 %igen Hemmung der N-Demethylierung von Aminopyrin. Das bedeutet, daß die Transhydrogenase durch die Wasserstoffübertragung von NADH auf NADP^+ das mitochondriale NAD(H)-System mit dem NADP(H)-System (Isocitratdehydrogenase) verbindet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Klingenberg, M. (1958) Arch. Biochem. Biophys. Acta 75, 376
- (2) Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. (1963) Biochem. Z. 338, 741
- (3) Ernster, L., Orrenius, S. (1965) Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 24, 1190
- (4) Jones, D.P., Mason, H.S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4874
- (5) Kauffman, F.C., Evans, R.K., Thurman, R.G. (1977) Biochem. J. 166, 583
- (6) Hogeboom, G.H., Schneider, W.C. (1950) J. Biol. Chem. 186, 417
- (7) Veech, R.L., Eggleston, C.V., Krebs, H.A. (1969) Biochem. J. 115, 609
- (8) Zuurendonk, P.F., Tager, J.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 393
- (9) Sies, H. (1978) Methods Enzymol. 52, 48
- (10) Berry, M.N., Friend, D.S. (1969) J. Cell. Biol. 43, 506
- (11) Sies, H., Großkopf, M. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 513
- (12) Remmer, H. (1959) Arch. Exp. Path. Pharmacol. 235, 279
- (13) Krebs, H.A., Hems, R., Tyler, B. (1976) Biochem. J. 158, 341
- (14) Sies, H., Akerboom, T.P.M., Tager, J.M. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 301
- (15) Davison, S.C., Wills, E.D. (1974) Biochem. J. 140, 461
- (16) Brodie, B.B., Axelrod, J. (1950) J. Pharmacol. Exp. Ther. 99, 171
- (17) La Du, B.N., Gaudette, L., Trousof, N., Brodie, B.B. (1955) J. Biol. Chem. 214, 741

- (18) Nash, B.T. (1953) *Biochem. J.* 55, 416
- (19) Bergmeyer, H.U. (1974) *Methoden der Enzymatischen Analyse*, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim
- (20) Thurman, R.G., Scholz, R. (1973) *Eur. J. Biochem.* 38, 73
- (21) Soboll, S., Scholz, R., Heldt, H.W. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 377
- (22) Shin, Y.S., Buehring, K.U. Stokstad, E.L.R. (1975) *Mol. Cell. Biochem.* 9, 97
- (23) Buehring, K.U., Batra, K.K., Stokstad, E.L.R. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 279, 498
- (24) Referenz gestrichen
- (25) Waydhas, C., Weigl, K., Sies, H. (1978) *Eur. J. Biochem.* 89, 143
- (26) Krebs, H.A., Cornell, N.W., Lund, P., Hems, R. (1974) in: *Regulation of Hepatic Metabolism* (Hrsg. Lundquist, F., Tygstrup, N.) S. 726, Munksgaard, Kopenhagen
- (27) Orrenius, S., Ericsson, J.L.E., Ernster, L. (1975) *J. Cell. Biol.* 25, 627
- (28) Cohen, B.S., Estabrook, R.W. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 37
- (29) Thurman, R.G., Scholz, R. (1969) *Eur. J. Biochem.* 10, 459
- (30) Sies, H., Brauser, B. (1970) *Eur. J. Biochem.* 15, 531
- (31) Moldeus, P., Grundin, R., Vadi, H., Orrenius, S. (1974) *Eur. J. Biochem.* 46, 351
- (32) Sies, H., Summer, K.-H., Bücher, Th. (1975) *FEBS Lett.* 56, 274
- (33) Krebs, H.A., Lund, P., Stubbs, M. (1976) in: *Gluconeogenesis -- its Regulation in Mammalian Species* (Hrsg. Hanson, R.W., Mehlman, M.A.) S. 269, J. Wiley, New York

- (34) Sies, H., Weigl, K. (1977) in: *Microsomes and Drug Oxidations* (Hrsg. Ullrich, V.) S. 307, Pergamon Press, Oxford
- (35) Weigl, K., Linke, I., Marklstorfer, A., Sies, H. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 322
- (36) Papa, S. (1969) in: *The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria* (Hrsg. Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E., Slater, E.C.) S. 401, Adriatica, Bari
- (37) Hoek, J.B., Ernster, L. (1974) in : *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems* (Hrsg. Thurman, R.G., Yonetani, T., Williamson, J.R., Chance, B.) S. 351, Academic Press, New York
- (38) Weigl, K., Sies, H. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 401
- (39) Weigl, K., Sies, H. (1978) in : *Industrial and Environmental Xenobiotics - in vitro versus in vivo biotransformation and toxicity* (Hrsg. Fouts, J.R., Gut, J.) S. 50, Excerpta Medica, Amsterdam- Oxford
- (40) Meijer, A.J., Gimpel, J.A., De Leeuw, G.A., Tager, J.M., Williamson, J.R. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7728
- (41) Williamson, J.R., Ohkawa, K., Meijer, A.J. (1974) in : *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems* (Hrsg. Thurman, R.G., Yontani, T., Williamson, J.R., Chance, B.) S. 365, Academic Press, New York
- (42) Meijer, A.J., Gimpel, J.A., De Leeuw, G., Tischler, M.E., Tager, J.M., Williamson, J.R. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2308
- (43) Kean, E.A., Gutman, A., Singer, T.P. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2346
- (44) Moyle, J., Mitchell, P. (1973) *Biochem. J.* 132, 571
- (45) Hoek, J.B., Ernster, L., deHaan, E.J., Tager, J.M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 333, 546

- (46) Thurman, R. G., Lurquin, M., Kauffman, F. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1060
- (47) Ullrich, V., Weber, P. (1972) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1171
- (48) Sies, H., Kandel, M. (1970) FEBS Lett. 9, 205
- (49) Sies, H., Häussinger, D., Großkopf, M. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 305
- (50) Sies, H., Weigl, K., Waydhas, C. (1978) in: The Induction of Drug Metabolism (Hrsg. Estabrook, R.W. & Lindenlaub, E.) Symposia Medica Hoechst 14, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart und New York
- (51) Negelein, E., Haas, H. (1935) Biochem. Z. 282, 206
- (52) Eggleston, L.V., Krebs, H.A. (1974) Biochem. J. 138, 425
- (53) Oshino, N., Chance, B. (1977) Biochem. J. 162, 509
- (54) Busch, U. (1975) Diplomarbeit Fachbereich Chemie und Pharmazie, Universität München
- (55) Junge, O., Brand, K. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 171, 398
- (56) Williamson, J.R. (1969) in: The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria (Hrsg. Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E. & Slater, E.C.) S. 385, Adriatica, Bari
- (57) Veech, R.L., Guynn, R.W. (1974) in: Regulation of Hepatic Metabolism (Hrsg. Lundquist, F. & Tygstrup, N.) S. 337, Munksgaard, Kopenhagen
- (58) Kleineke, J., Söling, H.D. (1976) 10th IUB Congress, Hamburg, Abstract 06-6-127
- (59) Scholz, R., Hansen, W., Thurman, R.G. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 64
- (60) LaNoue, K.F., Meijer, A.J., Brouwer, A. (1974), Arch. Biochem. Biophys. 161, 544

- (61) Palmieri, F., Quagliariello, E., Klingenberg, M. (1972)
Eur. J. Biochem. 29, 408
- (62) Siess, E.A., Brocks, D.G., Wieland, O.H. (1976)
FEBS Lett. 69, 265
- (63) Danielson, L., Ernster, L. (1963) Biochem. Z. 338, 188
- (64) Lee, C.P., Ernster, L. (1964) Biochim. Biophys. Acta
81, 187
- (65) Lee, C.P., Ernster, L. (1968) Eur. J. Biochem. 3, 385
- (66) Rydström, J., Teixeira da Cruz, A., Ernster, L. (1970)
Eur. J. Biochem. 17, 56
- (67) Friedman, B., Goodman, E.H., Saunders, H.C., Kostos, V.,
Weinhouse, S. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 566
- (68) Rognstad, R., Katz, J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6047
- (69) Sies, H. unveröffentlichte Ergebnisse

I ch d a n k e

...meinem geschätzten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Helmut Sies, für seine großartige und oft auch geduldige Anleitung, ohne die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre; er stand mir jederzeit mit wertvollen Anregungen zur Seite.

...Frau Annegret Marklstorfer und Frau Ingrid Linke für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Geboren am 16.1.1952 in Rosenheim als Sohn des Verkaufsberaters Franz Xaver Weigl und dessen Ehefrau Annemarie, geborene Fischer.

Von 1958 – 1962 Besuch der Knabenschule, dann Übertritt in das Finsterwalder – Gymnasium. 1971 Ablegung der Reifeprüfung.

1971 – 1972 Ableistung des Zivilen Ersatzdienstes beim Roten Kreuz.

1972 Beginn des Universitätsstudiums: Germanistik und Geschichte, Chemie und Physik.

1973 – 1975 Stelle als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Experimentelle Chirurgie des Klinikums Rechts der Isar der TU München.

Im Sommersemester 1974 Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilian – Universität München.

Im März 1976 Ablegung der Ärztlichen Vorprüfung

Von April 1976 bis Januar 1978 experimentelle Untersuchungen zu vorliegender Dissertation bei Herrn Prof. Dr. Helmut Sies am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München.

Im März 1977 Ablegung des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.

Im März 1979 Ablegung des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.

April 1979 bis März 1980 Ableistung des Praktischen Jahres.

April/ Mai 1980 schriftliche und mündliche Prüfung des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.

